Untersuchungen an durch Röntgenstrahlen induzierten Zwergkolonien von Salmonella typhimurium

Hans Weber

1962

Aus dem Institut für Tierhygiene der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

UNTERSUCHUNGEN AN DURCH RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERTEN ZWERGKOLONIEN VON SALMONELLA TYPHIMURIUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Hans Weber
aus München

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Ullrich

Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 27. Februar 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNI-DRUCK, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	SCHRIFTTUM	2
	A. Allgemeine Strahlenbiologie	2
	1. Ionisierende Strahlen und ihre Wirkung auf Materie	2
	2. Direkte und indirekte Wirkung	4
	3. Wirkung ionisierender Strahlen auf lebende Zellen	5
	4. Radiomimetica	7
	5. Die Sauerstoffwirkung	8
	6. Vergleich der Strahlenempfindlichkeit lebender Organismen	8
	7. Wiederherstellungsvorgänge nach der Bestrahlung	10
	8. Chemische Schutzwirkung gegen Bestrahlung	10
	B. Ionisierende Strahlen in der Bakteriologie	11
	1. Natürliche Sensibilität von Bakterien gegenüber Bestrahlung	11
	2. Die Wirkung ionisierender Strahlen auf Bakterien	13
	a) Die Inaktivierung	13
	b) Genetische und nichtgenetische Effekte	14
	3. Faktoren, die die Effekte ionisierender Strahlen auf Bakterien ändern	16
	C. Die bakterielle Dissoziation	19
	1. Begriffsklärung	19
	2. Die Typen der bakteriellen Dissoziation	20
	3. Der Verlauf der bakteriellen Dissoziation	22
	4. Faktoren, die die bakterielle Dissoziation begünstigen	23
	a) erbliche Faktoren	
	b) milieubedingte Faktoren	

Seite

5. Das Wesen der bakteriellen Dissoziation 25
   a) Mutation
   b) Adaption
   c) 'Dauermodifikationen'
   d) Lebenszyklen

D. Zwergkolonien 28
   1. Spontan entstandene Zwergkolonien 28
   2. Induzierte Zwergkolonieformen 29

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 34

A. Material 34
   1. Bakterienstammkultur 34
   2. Zur Bestrahlung der Bakterien verwendete Petrischälchen 34
   3. Nährmedien 34

B. Methodik 36
   1. Verdünnung und 'Waschen' von Bakteriensuspensionen 36
   2. Bestrahlung der Bakteriensuspensionen 37
   3. Kulturverfahren 37
   4. Besichtigung der Kolonien 37
   5. Besondere Verfahren zur Erkennung koloniemorphologischer Varianten 38
   6. Agglutination 38

C. Versuche und Versuchsergebnisse 39
   1. Vorbehandlung und Bestrahlung der Bakterien 39
   2. Züchtung auf festen Nährmedien 39
   3. Beobachtung der wachsenden Kolonien unbestrahlter Keime 40
   4. Beobachtung der wachsenden Kolonien bestrahlter Keime 40
   5. Isolierung und Subkultur von Zwergkolonien und unbestrahlten Vergleichskolonien 52
   6. Koloniemorphologie der Subkulturen 52

Seite

7. Zellmorphologie der Subkulturen 54
8. Wachstum der Subkulturen in flüssigem Medium 54
9. Biochemische Untersuchung der Subkulturen 55
10. Serologische Untersuchung der Subkulturen 59

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 63

V. ZUSAMMENFASSUNG 68

VI. LITERATURVERZEICHNIS 69

LEBENSLAUF

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0072

I. EINLEITUNG

Als W. C. Röntgen im Jahre 1895 die später nach ihm benannten Strahlen entdeckte, konnte er und mit ihm wohl niemand ahnen, eine wie große Bedeutung und verschiedenartige Verwendung die Röntgenstrahlen einmal erlangen sollten.

1912 erkannte M. v. Laue die Beugung und Interferenz dieser Strahlung beim Durchgang durch Kristalle, wodurch in der Erforschung der Materie (z. B. in der Kenntnis des inneren Aufbaus der Kristalle) große Fortschritte ermöglicht wurden. In der Technik benützt man die hohe Durchdringungskraft der Röntgenstrahlen zur Materialprüfung.

In der Medizin erlangten sie eine überragende Bedeutung; besonders in der Diagnostik von Krankheiten auf Grund ihres Durchdringungsvermögens und ihres photochemischen Effektes und in der Therapie bösartiger Neubildungen durch ihre ionisierende, zellschädigende Wirkung.

Die naturwissenschaftliche und medizinische Forschung benützen diese ionisierende, mutagene Wirkung zur Erforschung der Lebensvorgänge und der großen genetischen Probleme.

Auch in der Bakteriengenetik wurden mit Hilfe der Röntgenstrahlen bedeutende Fortschritte erzielt.

Bei den Arbeiten am Tierhygienischen Institut der Universität München war verschiedentlich das Auftreten sehr kleiner Kolonien nach Züchtung röntgenbestrahlter Brucellen, Salmonellen und Colikeime auf festem Nährmedium beobachtet worden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, unter Berücksichtigung der strahlenbiologischen und genetischen Forschungsergebnisse das eigenartig verminderte Wachstum dieser 'Zwergkolonien', auch im Hinblick auf neue immunbiologische Erkenntnisse, bei dem Bakterienstamm Salmonella typhumurium (Breslau S) zu untersuchen.

II. SCHRIFTTUM

A. Allgemeine Strahlenbiologie

1. Ionisierende Strahlen und ihre Wirkung auf Materie

BACQ u. ALEXANDER (10) charakterisieren die in der Strahlenbiologie bekannten Strahlenarten folgendermaßen:

a) Röntgen- und Gammastrahlen sind elektromagnetische Wellen, die durch ihre Kurzwelligkeit (0,06 - 0,01 Å) eine 10^4 mal größere Quantenenergie als UV-Strahlen besitzen und daher wenig Ähnlichkeit mit diesen oder mit sichtbarem Licht haben. (Die Licht- bzw. UV-Absorption hängt im allgemeinen von der molekularen Struktur des absorbierenden Mediums und nur indirekt von dessen atomarer Zusammensetzung ab. Bei Absorption eines Lichtquants wird dessen ganze Energie im Molekül gespeichert. Das auf diese Weise angeregte Molekül kann dann irgendeine unter mehreren möglichen Reaktionen verursachen oder die Energie in Form von Wärme oder auch Fluoreszenzstrahlung wieder abgeben.)

Die Energie der Röntgen-(=X-)Strahlen wird fast ganz dadurch absorbiert, daß aus den Atomen, welche von den Strahlen durchquert werden, Elektronen ausgelöst werden. Bei der Absorption eines Röntgenquants, das ist der kleinste absorbierbare Strahlungsteil, wird ein Elektron aus dem Atomverband herausgelöst. Da ein Röntgenquant aber in der Regel mehr Energie besitzt, als zur Emission eines Elektrons aus der Atomhülle notwendig ist, wird die überschüssige Energie dem Elektron als kinetische Energie mit auf den Weg gegeben. Dadurch wiederum ist das Elektron in der Lage, weitere Atome, die es durchquert, zu ionisieren.

b) Beta-Strahlen wirken wie die durch Röntgenstrahlen erhaltenen Elektronen, wenn sie auch deren Energie besitzen. Ihre Reichweite in Wasser oder in biologischem Gewebe beträgt selbst bei energiereichen Elektronen nur 5 - 7 mm.

c) Schwere ionisierende Teilchen: Alpha-Strahlen mit einer ungefähren Reichweite von 70 Å und Protonen mit etwas größerer Reichweite ionisieren selbst; Neutronen dagegen schlagen aus dem Kern des Atoms, das sie durchqueren, Protonen heraus. Sehr langsame Neutronen schleichen sich in den Kern eines Atoms ein; dadurch entsteht ein neues Element, das meist Beta- oder Gamma-Strahlen ausstrahlt.

Ein Strahlenquant kann seine Energie vollständig an ein in einem Atom gebundenes Elektron abgeben. Dies ist vor allem bei energiearmen Strahlen (z. B. weichen Röntgenstrahlen) der Fall und wird photoelektrischer Effekt genannt. Das Strahlenquant kann seine Energie aber auch an mehrere Atome bzw. Elektronen abgeben; die einzelnen ausgeschleuderten Elektronen haben dann natürlich eine geringere Energie. Diesen sogenannten Comptoneffekt erzeugen energiereiche Strahlen. Ein energiereiches Elektron erzeugt so lange Ionisationen, bis es als sogenanntes thermisches Elektron in einem Molekül absorbiert wird und somit ein negatives Ion bildet. Die so aufgenommene Energie wird als Wärme oder Fluoreszenz wieder abgegeben, oder aber sie bewirkt chemische Umsetzungen.

Bei einer Ionisation gibt ein energiereiches Elektron soviel Energie ab, daß ein sekundäres Elektron aus einem Molekül ausgestoßen werden kann, das wiederum die Bildung eines Ionenpaares verursacht. Das Ionenpaar besteht aus einem positiven (durch Verlust eines Elektrons) und einem negativen Ion (durch Aufnahme eines Sekundärelektrons). Natürlich kann das sekundäre Elektron auch soviel Energie erhalten, daß es selbst wieder mehrere Ionisationen verursachen kann.

Nach GRAY (50) werden 1/3 der Ionenpaare durch das ionisierende Teilchen (Elektron) direkt und 2/3 indirekt von Sekundärelektronen gebildet.

Außer der Ionenpaarbildung, bei der keine große Energieänderung eintritt, kann ein losgelöstes Elektron auch von einem positiven Ion eingefangen werden. Bei dieser 'Neutralisation' wird sehr viel Energie frei. Strahleninduzierte Radikalionen unterscheiden sich von stabilen (dissoziierten) Ionen durch ihre ungerade Anzahl von Elektronen und die damit verbundene größere chemische Aktivität.

Die Ionisationsdichte, also die Anzahl der Ionisationen in einem bestimmten Volumen, ist am Ende der Elektronenbahn am größten, weil hier die

Teilchen eine geringere Geschwindigkeit und damit eine größere Ionisationsmenge pro Volumen haben. Deshalb sind auch weiche, langwelligere, und damit energieärmere Röntgenstrahlen bei Bestrahlung kleiner Volumina wesentlich wirkungsvoller als harte, energiereiche Röntgenstrahlen.

EYRING u. a. (44) wiesen als erste das Vorkommen der 'Anregung' nach. Nach ihren Ausführungen durchquert das ionisierende Teilchen eine gewisse Anzahl von Atomen, ohne daß ein Elektron herausgelöst wird. Vielmehr werden einige Elektronen im Atom auf ein höheres Energieniveau gebracht.

2. Direkte und indirekte Wirkung

Ausgangspunkt für eine chemische Änderung gewisser Zellbestandteile können nach DALE (29) zwei verschiedene Mechanismen sein:

a) Bei der direkten Wirkung wird das Molekül, an dem die chemische Änderung geschieht, selbst dadurch ionisiert oder angeregt, daß ein Elektron das Molekül durchquert.

b) Bei der indirekten Wirkung absorbiert das betrachtete Molekül die Energie nicht direkt von einem Elektron, sondern erhält sie indirekt durch Übertragung von einem anderen ionisierten oder angeregten Molekül. In wässerigen Systemen wird sie wahrscheinlich durch die aus dem Wasser gebildeten freien Radikale hervorgerufen.

Nach BACQ u. ALEXANDER (10) ist der Prozeß dann indirekt, wenn 'aktiviertes Wasser' über eine Strecke, die größer als ein paar Moleküldurchmesser ist, zum Ort der Reaktion hin diffundiert.

Die indirekte Wirkung wird durch Sauerstoff verstärkt, ebenso, nach ALEXANDER u. CHARLESBY (2), durch erhöhte Temperaturen. Bei der direkten Wirkung wird nach der Meinung von BACQ und ALEXANDER (10) das ionisierte Molekül abgebaut, während bei der indirekten Wirkung das freie Radikal aus der Umgebung sich entweder an das Molekül anlagern oder ein Atom bzw. eine Atomgruppe von ihm abspalten kann.

Die zuerst von GROWTHER (51) 1924 beschriebene Treffertheorie besagt, daß die Mitoseunterbrechung das Ergebnis einer einzigen Ionisation sei. Später erweiterte der gleiche Autor die Theorie zur Mehrtreffertheorie für die Fälle, bei denen mehr als eine Ionisation pro Organismus zur Inaktivierung nötig ist.

LEA (80) glaubt, daß die chemische Umformung des Moleküls, in dem ein Atom ionisiert wurde, die meisten durch Strahlen induzierten chemischen Änderungen bewirkt; die Anregung könne vernachlässigt werden.

McLAREN (93) dagegen erbrachte einwandfreie Beweise einer gleichen Reaktion durch Anregung wie durch Ionisation.

Die heutige Definition der Treffertheorie lautet (10): Es findet dann eine Inaktivierung statt, wenn eine Ionisation und eine unbekannte Anzahl von Anregungen in einem vom Trefferbereich umschlossenen Raum erzeugt werden.

Nach GETLOW u. DOYLE (47) ist die Größe des Trefferbereiches temperaturabhängig. Die Inaktivierungsdosis nimmt mit Temperaturzunahme ab. POLLARD (109) erklärt dies damit, daß bei höheren Temperaturen eine Inaktivierung durch Ionisation und durch Anregung eintritt, bei niederen Temperaturen nur durch Ionisation.

3. Wirkung ionisierender Strahlen auf lebende Zellen

Infolge des Strahleninsultes kommt es zur Mitosehemmung, jedoch sind die einzelnen Zellen unterschiedlich empfindlich (12).

Daraus schließt SPEAR (123), daß die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer Bestrahlung direkt proportional ihrer reproduktiven Aktivität und umgekehrt proportional dem Grad ihrer Differenzierung ist.

Die Ansicht vieler Zytologen, daß die durch Bestrahlung induzierten Chromosomenbrüche die Ursache der Inaktivierung und bestimmter genetischer Effekte seien, bezweifeln BACQ und ALEXANDER (10), da die Häufigkeit von Chromosomenanomalien von der Dosisleistung abhängig ist,

die Häufigkeit der Mutationen dagegen dosisproportional und unabhängig von der Zeit, in der bestrahlt wurde.

Auch D'AMATO u. GUSTAFSON (30) zeigten, daß Zellkerne, die von dem sie umgebenden Zytoplasma befreit wurden, sehr strahlenresistent wurden. Wurden unbestrahlte Kerne in bestrahltes Cytoplasma gebracht, so zeigten diese bald charakteristische Strahlenläsionen.

In manchen Fällen können jedoch die Proteine des Plasmas als Schutzstoffe wirken, wie dies BACK u. BLOCK-FRANKENTHAL (7) an Kernen bestrahlter Hühnerblutkörperchen feststellen konnten.

Wie man an Hand der Bakterientransformationen und der Behandlung von Fischspermien (10) feststellen konnte, ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS) die wahrscheinliche genetische Substanz. Sie unterscheidet sich durch verschiedene Purin- und Pyrimidinseitenketten von der von ihr unabhängig gebildeten, im Cytoplasma und hauptsächlich im Zellkern (BRACHET (17)) vorkommenden Ribonukleinsäure (RNS).

DNS wird im Zellkern gebildet, und zwar in der Mitte der Interphase der Zellteilung (HOWARD u. PELC (107)). Zu diesem Zeitpunkt ist die Zelle auch besonders strahlenempfindlich. Schon die Wirkung von 35 Röntgen ist nachweisbar. Sie äußert sich in einer Mitosehemmung. Die Hemmung der DNS-Synthese schließt also eine Hemmung der Mitose ein. Es besteht keine Beziehung zu Chromosomenfragmentationen, denn diese treten erst am Ende der Ruhephase auf, an der gar keine DNS mehr gebildet wird.

Wahrscheinlich findet keine Unterbrechung der zur DNS-Synthese notwendigen Energieversorgung statt (10), wie dies von vielen Autoren als Folge von Fermentblockierungen und somit gleichzeitiger Erschöpfung der Energiequellen und Bildung toxischer Stoffe angenommen wird. Wohl aber kann nach Bestrahlung ein dauerhafter biochemischer Schaden verursacht werden (siehe später).

Schon 1925 stellten ANCERL u. VITEMBERGER (4) fest, daß drei 'essentielle Gesichtspunkte' bei der Bestrahlung zu unterscheiden seien:
a) die Strahlenschädigung, b) die Faktoren, die die Schädigung manifest werden lassen, und c) die Faktoren der Regeneration und Heilung.

Von BACQ u. HERVE (11) ist auch eine Änderung der Permeabilität bestimmter intrazellulärer Strukturen nach Bestrahlung beobachtet worden, z. B. allein durch Änderung der Lokalisation von Enzymen innerhalb der Zelle. So erklären BACQ u. ALEXANDER (10) die Strahlenwirkung als einen Zusammenbruch der organisierten Struktur. Aus der Tatsache, daß eine kleine Strahlendosis viel mehr Moleküle beeinflußt, als aus der Zahl der freien Radikale erklärt werden kann, schließen sie, daß Fermente und Substrate, die normalerweise voneinander getrennt sind, in Wechselwirkung treten können.

4. Radiomimetika

Nach BACQ u. ALEXANDER (10) haben Radiomimetika, das sind chemische Substanzen, die biologisch ähnlich wirken wie ionisierende Strahlen, folgende Wirkungen auf den Ruhekern: Sie rufen Chromosomenbrüche und Genmutationen hervor und induzieren Tumoren. Außerdem bleichen sie die Haare, rufen charakteristische akut- und chronischdegenerative Veränderungen in Knochenmark, Darmschleimhaut, Testes und eine identische Störung der Blutgerinnung hervor, schalten die Antikörperbildung aus und haben eine ausgeprägte wachstumshemmende Wirkung.

Die Radiomimetika wirken vor allem auf den Zellkern, ihre Wirkung auf das Cytoplasma ist zehn mal niedriger als die der ionisierenden Strahlen. Die bekanntesten Substanzen sind Schwefellost, Stickstofflost, Äthylenimin, Methansulfonsäureester u. v. a. Ausgedehnte Literatur hierüber findet sich bei PHILIPS (108) und BACQ (8).

Die Wirkung auf das Cytoplasma beruht meist auf der monofunktionellen Alkyl-Gruppe, durch die Anwesenheit einer zweiten wirksamen Gruppe wird die Aktivität oft erheblich gesteigert. HADDOW (53) u. a. schreiben vor allem den Substanzen mit 2 Alkyl-Gruppen eine starke Wirksamkeit zu.

Nach BRYSON (22) kann E. coli gegen N-Lost resistent werden; damit wird er gleichzeitig auch strahlenresistent. Ebenso können strahlenresistente Keime auch lostresistent sein.

5. Die Sauerstoffwirkung

BACQ u. ALEXANDER (10) stellten fest, daß a) bei fehlendem Sauerstoff oder reduziertem Sauerstoffdruck die Wirkungen von Röntgen- und Gammastrahlen zwar verringert, aber nicht aufgehoben werden, b) der Sauerstoff während der Bestrahlung anwesend sein muß, und c) die Wirkungen von Alphastrahlen und Neutronen viel weniger von Sauerstoff abhängig sind.

Nach ALPER u. HOWARD-FLANDER (3) und GRAY (50) ist die größte Strahlenempfindlichkeit bei 3 - 4 % Sauerstoffspannung vorhanden, wenn das Gas kontinuierlich durch die zu bestrahlende Flüssigkeit geleitet wird.

6. Vergleich der Strahlenempfindlichkeit lebender Organismen

RUGH (111) und TOBIAS gaben für verschiedene Tiere folgende LD 50/30 d an:

Organismus	Strahlung	Dosis (in Röntgen)
Meerschweinchen	Röntgenstrahlen	175 - 409
Schwein	"	275
Hund	"	300 - 430
Ziege	"	350
Affe	"	500
Mensch	"	400 - 500
Maus	schnelle Neutronen	54 n
	Alpha-Teilchen	14 µC/G
	Beta-Teilchen	250 µC/G
Ratte	Röntgenstrahlen	590 - 970
Kaninchen	"	750 - 825
Hamster	"	725
Huhn	"	1000
Goldfisch	"	670
Frosch	"	700

Organismus	Strahlung	Dosis (in Röntgen)
Wassermolch	Röntgenstrahlen	3000
Schildkröte	"	1500
Schnecke	"	8000 - 20000
Escherichia coli	"	5600
Hefe	"	30000
Amoebe	"	100000
Bact. mesentericus	"	150000
Colpidium, Paramaecium	"	300000
Infusorien	"	350000

BACQ u. ALEXANDER (10) berichten über die Strahlenempfindlichkeit:

a) Unter den Vertebraten sind Säuger am empfindlichsten, obwohl z. B. Vögel eine höhere Körpertemperatur und damit eine größere Stoffwechselaktivität besitzen als jene.

b) Einzellige Organismen sind sehr widerstandsfähig. Eine Ausnahme bildet nach FORSSBERG (45) der Pilz Phyomyces blakesleeanus, dessen Wachstum schon bei 0,01 Röntgen beeinflußt wird.

c) Insekten sind verhältnismäßig widerstandsfähig, in den verschiedenen Entwicklungsstadien sind sie unterschiedlich empfindlich. SULLIVAN u. GROSCH (130) fanden allerdings bei einer parasitären Wespe nach Bestrahlung mit 180 000 Röntgen eine Verlängerung der Lebensdauer dieses Tieres.

d) Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Pflanzen wird zum Teil auf den unterschiedlichen Askorbinsäuregehalt (Schutzstoffe?) zurückgeführt. Trockene Samen vertragen zwischen 2000 und 64 000 Röntgen. In vielen Fällen regt jedoch nach SAX (114) eine geringe Dosis (2000 - 8000 Röntgen) das Wachstum an.

BLINKS (16) berichtet, daß Algen auf höchst radioaktiven Riffen bei Bikini nicht verändert, also sehr strahlenresistent sind. Eine eigentliche Erklärung der unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit wurde noch nicht gefunden.

7. Wiederherstellungsvorgänge nach der Bestrahlung

Theoretisch gibt es nach LATARJET (79) zwei Möglichkeiten der Wiederherstellung:
a) eine Neutralisation der Primärwirkungen, d. h. der freien Radikale und der direkten Wirkung. Sie wurde jedoch noch nicht festgestellt;
b) eine Neutralisation der Sekundärwirkungen.

Der gleiche Autor wies schon 1952 auf die Bedeutung der Katalase und der Peroxydase, die die gebildeten Peroxyde zerstören, und des sichtbaren und infraroten Lichts (Photoreaktivierung!) hin. HOLLAENDER (siehe B 2) beschreibt die teilweise Wiederherstellung von Bakterien bei suboptimalen Temperaturen und durch gewisse Schlüsselsubstanzen.

Die Wiederherstellungsvorgänge deuten nach BACQ (10) an, daß die Strahlenschädigungen oder Mutationen nicht durch oder unmittelbar nach Bestrahlung zustandekommen, sondern als Folge eines Stoffwechselprozesses innerhalb der bestrahlten Zelle auftreten.

8. Chemische Schutzwirkung gegen Bestrahlung

Die Wirkung gewisser Stoffe, die chemisch gegen Strahlen schützen, beschreibt BACQ (10) folgendermaßen:
a) Die Schutzstoffe wirken nur, wenn sie während der Bestrahlung anwesend sind.
b) Jede Schutzsubstanz wirkt spezifisch. Die Schutzwirkung von Zysteamin an E. coli z. B. ist bei 6000 Röntgen am größten, bei höheren Dosen nimmt sie ab. Gleichzeitig wird die Schutzwirkung von Merkaptoäthanol mit zunehmender Dosis größer, ebenfalls bis zu einem gewissen Maximum.
c) Wahrscheinlich vermindern die Schutzstoffe die Strahlenwirkung durch Herabsetzen der Sauerstoffspannung im Zellinneren.

HOLLAENDER u. STAPLETON (62) glauben, daß die Schutzwirkung nicht vollständig durch Sauerstoffentzug zu erklären ist. Sie nehmen vielmehr eher ein Wettrennen der Schutzstoffe mit den strahlenempfindlichen, biologischen Molekülen um die oxidierenden freien Radikale an, oder aber den Ersatz eines Stoffwechselproduktes, das durch die Strahlung zerstört und durch die Schutzstoffe ersetzt wird.

Eine vollständige Bibliographie der Schutzstoffe findet sich bei BACQ (9). Danach werden zu den Schutzstoffen gerechnet:

a) Zyanide, z. B. NaCN, KCN
b) Sulfhydrilverbindungen mit der wirksamen -SH- oder -NH_2- Gruppe, z. B. Zystein, Zysteamin
c) Chelatbildner, z. B. Diäthyl-dithio-carbamat
d) In geringem Maße Alkohole, Zucker und andere Substanzen mit -OH-Gruppen
e) Karbonsäuren, Aminosäuren und Amine
f) Reduzierende Substanzen ohne -SH-Gruppe, z. B. Natriumdithionat ($Na_2S_2O_4$), Bisulfit ($NaHSO_3$), Metasulfit ($Na_2S_2O_5$)
g) Hämoglobinbindende Substanzen und Kohlenmonoxyd, z. B. Amino-propiophenon, Natriumnitrit ($NaNO_2$)
h) Verschiedene Substanzen, z. B. Morphin, Triphenyltetrazoliumchlorid, Megaphen, Askorbinsäure, u. a.

Für die Mikrobiologie sind vor allem verwendbar: Dimerkaptipropanol (BAL), Natriumhydrosulfit (reagiert mit molekularem Sauerstoff in Lösung!), Thiobernsteinsäure und Merkaptobrenztraubensäure.

B. Ionisierende Strahlen in der Bakteriologie

1. Natürliche Sensibilität von Bakterien gegenüber Bestrahlung

LEVIN u. LOMINSKI (83) stellten schon 1935 fest, daß säurefeste und sporenbildende Bakterien gegenüber Röntgenstrahlen am wenigsten empfindlich waren, daß grampositive Keime eine Mittelstellung einnahmen und daß gramnegative Bakterien die größte Empfindlichkeit zeigten. Auch zwischen den verschiedenen Gattungen und Arten und sogar innerhalb der Arten fand man große Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit. WITKIN (140) schreibt die Unterschiede innerhalb der Arten den während oder schon vor der Bestrahlung stattfindenden unterschiedlichen Spontanmutationsraten zur Resistenz zu.

ZELLE u. OGG (147) fanden durch Behandlung eines Colistammes mit Kampferdämpfen einen sehr strahlenresistenten Mutantenstamm, dessen

sehr große Zellen augenscheinlich die di- oder polyploide Ableitung des Ausgangsstammes darstellten.

Nach STAPLETON (72) spielt das Alter der zu bestrahlenden Kulturen eine sehr große Rolle.

Abb. 1 zeigt, daß die Resistenz während und besonders am Ende der sog. 'Lag-phase' sehr groß ist. Diese 'Verzögerungs-Phase' erfaßt die Zeitdauer, in der sich zwar die Zellen noch nicht teilen, in der aber die Zellen schon vielkernig sind. (Junge Zellen sind meist vielkernig, es teilt sich zuerst der Zellkern mehrmals, bevor sich die ganze Zelle teilt.) Während der Zellteilungs-Phase (logarithmic-phase) steigt auch die Sensibilität der Keime und erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt der meisten Zellteilungen. Danach, im Statium der 'Maximal-Stillstand-Phase', steigt die Resistenz wieder langsam an.

BRYSON (22) betrachtet die Mutation zur Resistenz als eine durch langdauernde Selektion sich langsam steigernde Resistenz gegen oxydierende Einflüsse.

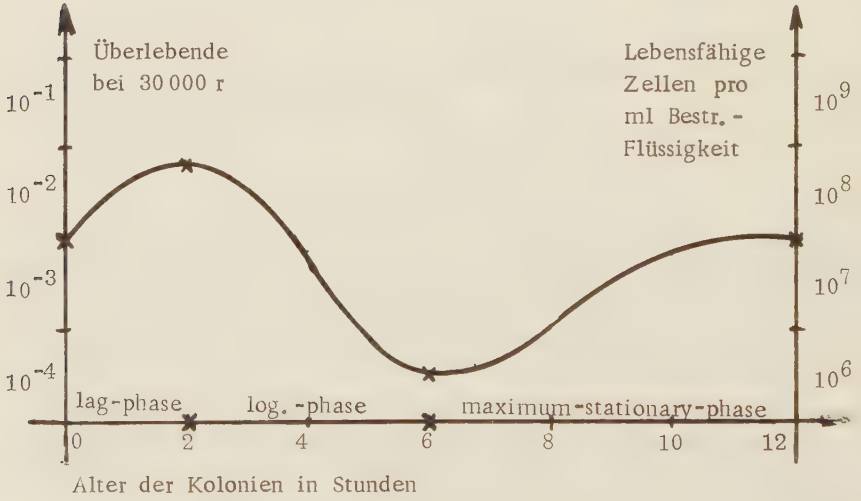

Abb. 1 (nach STAPLETON (72): Abhängigkeit der Strahlensensibilität vom Alter der Kulturen)

2. Die Wirkung ionisierender Strahlen auf Bakterien

KELNER (72) teilt die Ereignisse in einer bestrahlten Bakterienzelle in drei Perioden ein: Die Anfangsperiode schließt den Augenblick der Bestrahlung, die ersten Reaktionen, Ionisationen und Excitationen ein. Die Dauer der mittleren Periode ist abhängig von der Temperatur und vom Menstruum der Zellen. Während dieser Zeit ist die Zelle in einem ungewöhnlichen, physiologischen Zustand, der charakterisiert ist durch Behinderung der DNS-Synthese und der Synthese der adaptiven Enzyme. Die Endperiode schließlich erfaßt die Zeit, in der sich die Alteration oder Läsion manifestiert.

a) Die Inaktivierung

Man spricht, wie KIMBALL (73) vorschlägt, besser von Inaktivierung als von einer Abtötung der Bakterien, weil nicht bekannt ist, ob die Bakterienzellen wirklich abgestorben sind oder aber die Fähigkeit verloren haben, sich zu vermehren.

WYKOFF (142) hat festgestellt, daß das Volumen der empfindlichen Zellbestandteile, deren Zerstörung den Tod des Bakteriums zur Folge hat, weniger als 0,06 % der Bakterienzelle ausmacht.

LEA (81) fordert eine Veränderung des genetischen Materials durch Bildung toxischer Produkte (z. B. H_2O_2) über die freien Radikalionen. Die von RAHN (110) 1930 interpretierte Theorie einer Inaktivierung durch Letalmutation versucht er durch die Entdeckung zu erhärten, daß E. coli z. B. wahrscheinlich 250 Gene mit einem Durchmesser von je 12 Millimikron hat, von denen jedes fähig ist, zur Letalität zu mutieren.

WORDECK u. Mitarbeiter (141) schreiben die Inaktivierung der Depolimerisation von Nukleinsäuren durch die Temperaturerhöhung bei direkter Wirkung oder indirekt den von den Radikalen gebildeten Giftstoffen zu. KELNER (71) behauptet, Letalität, Mutationsinduktion und Verhinderung der adaptiven Enzymsynthese seien nur Folgen der Hemmung der DNS-Synthese.

Nach STUYs (129) Beobachtungen jedoch steht der Zusammenbruch der DNS-Synthese in keinem Verhältnis zum Zelltod.

KIMBALL (73) diskutiert zwei Möglichkeiten einer nichtgenetischen Kernschädigung: Entweder findet eine Zertrümmerung des Enzymsynthetisierungsmechanismus oder des DNS-Synthetisierungsmechanismus statt; beide haben den Tod der Bakterienzelle zur Folge.

Versuche von SPOERL u. LOVELESS (124) zeigen, daß nur die Zellteilung, nicht aber das Zellwachstum bei Bestrahlung von E. coli behindert wird. Ob dies auf eine Hemmung der Zellvermehrung oder auf eine Verhinderung des Zelltrennungsmechanismus zurückzuführen ist, konnte noch nicht entschieden werden.

Interessant ist die Beobachtung von LWOFF und Mitarb. (49), daß die Bakteriophagenproduktion und die Lysis in lysogenen Bakterien durch kleine Bestrahlungsdosen induziert wird.

Von NORMAN (103) wird zusammenfassend angenommen, daß sowohl Letalmutationen als auch nichtgenetische Zerstörung des Kerns die Strahlentötung verursachen können.

b) Genetische und nichtgenetische Effekte

Nach ZELLE (72) werden im allgemeinen durch ionisierende Strahlen dieselben Mutanten (Varianten) erhalten wie bei Spontanmutationen, nur wird die Mutationsrate durch Strahlung mehr oder weniger stark (10 - 100 000fach und mehr) erhöht. Als Mutantentypen erscheinen biochemische Mutanten, Mutanten mit Veränderungen in der Morphologie, Virulenz und Antigenität und Mutanten mit Resistenz gegen Hemmstoffe, z. B. Antibiotika, Phagen und X-Strahlen.

Ausnahmsweise war bei zwei auxotrophen Colistämmen nach DEMEREC u. CAHN (33) weder durch Bestrahlung, noch durch mutagene Substanzen die Spontanmutationsrate zu erhöhen.

Wie WITKIN (140) u. v. a. beweisen konnten, sind die durch ionisierende Strahlen hervorgerufenen Mutationen völlig ziellos und unspezifisch gerichtet.

Im allgemeinen steigt nach ZELLE (72) die Mutationsrate mit der Bestrahlungsdosis und dem Letaleffekt. Sie hat jedoch für jedes Bakterium ein ganz bestimmtes Maximum. Außerdem variiert das quantitative Anwach-

sen der Mutationsrate beträchtlich innerhalb verschiedener Mutationssysteme und verschiedener Bestrahlungsarten (GLOVER (49)).

ZLATA (149) wies nach, daß verschiedene mutagene Substanzen und ionisierende Strahlen spezifische Effekte an verschiedenen Genen produzieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß mutagene Spezifität und Stabilität Eigenschaften sind, die mehr durch die Lage der einzelnen Genloci als durch die Lage der Gene bestimmt sind.

Einen großen Unterschied gegenüber Spontanmutationen fand DEMEREC (32) im vermehrten Auftreten der Mutanten nach Bestrahlung von E. coli. Erst nach zwölf Generationen der normalen Keime konnten T1-phagenresistente Mutanten nachgewiesen werden. Spontanmutanten erschienen demgegenüber schon nach zwei Generationen.

NEWCOMBE u. SCOTT (101) erzielten ähnliche Resultate. Ihrer Meinung nach beruht das verzögerte Erscheinen der induzierten Mutanten:
a) darauf, daß die Bakterienzelle erst ein paar Teilungen durchmachen muß, ehe die Mutation phänotypisch sichtbar wird (sog. Nullpunktmutanten). Dies entspricht den Verhältnissen bei der Spontanmutation und ist als ein physiologischer Mechanismus anzusehen (Nachwirken nichtmutierter Einheiten, Enzyme u. dgl.);
b) darauf, daß viele der bestrahlten Keime (nach DEMEREC (32) bis 99%) sich erst dann zu teilen beginnen, wenn die übrige Population bereits mehrere Teilungen durchgemacht hat. 1953 erklärte NEWCOMBE (100) dieses Phänomen in einer kombinierten Verzögerung der bestrahlten Zellen. Eine Absonderung mutierter Kerne in vielkernigen Zellen (rezessive Mutanten) bedingt eine phänotypische Verzögerung, eine verzögerte Mutation und damit auch eine Unregelmäßigkeit im Einsetzen der Teilung, die nach Meinung des Verfassers aber auch durch zytoplasmatische Faktoren bedingt sein kann.

In RYANs (112) Versuchen zeigten die Mutanten eine zeitliche Verzögerung bis zu ihrem Erscheinen zwischen 10 und 24 Stunden, während die nicht mutierten Zellen sofort wuchsen. RYAN glaubt, daß, wenn die Mutationen während der ersten Generationen stark ansteigen, möglicherweise erst durch das verzögerte Wachstum als Ursache der Strahlenschädigung die Mutationen wahrscheinlich gemacht werden.

BRAUN (21) meint, daß die Verzögerung durch eine Serie von intermediären Schritten nach der Bestrahlung zu erklären sei. Einmal angegriffen, könne ein Gen einige Zeit in einem mutablen Zustand sein, bevor es entweder in den alten, normalen Zustand zurückgehe, oder aber durch Mutation verändert würde.

DEVI u. Mitarb. (35) bewiesen, daß Mutationen in sich nichtteilenden Zellen unabhängig von Wachstum und Teilung der Zelle eintreten. Sie bestrahlten getrocknete Aerogenes-Bakterien mit 30 - 50 Kiloröntgen und erhielten bei 10^{-3} bis 10^{-4} Überlebenden bis zu 1% biochemische Mutanten. Ein erheblicher Teil dieser Mutanten zeigte 'Adaption', d. h. er begann nach einer Latenzzeit von 24 Stunden und mehr auf Minimalnährböden zu wachsen. Nach einer Passage auf Nährböden mit dem vorher benötigten Wirkstoff ging die Veränderung wieder verloren. DEVI glaubt, daß entweder eine Erbänderung zur Erzeugung eines veränderten Enzyms führt, oder daß ein Enzym nicht mehr synthetisiert werden kann, oder aber daß ein Gen inaktiviert wird, das normalerweise die Wachstumsrate eines enzymartigen Plasmagens kontrolliert. In diesem Fall und in ähnlichen Fällen ist nicht einwandfrei zu klären, ob es sich dabei um genetische oder nichtgenetische Effekte handelt. KIMBALL (73) z. B. vertritt die Meinung, daß eine Bestrahlung die - wahrscheinlich nichtgenetische - Bildung neuer Enzymbildungszentren (z. B. Bildung von Penicillinase) verhindert und daß auf diese Weise, also durch den Verlust der Adaptionsfähigkeit, auxotrophe Mutanten entstehen können.

3. Faktoren, die die Effekte ionisierender Strahlen auf Bakterien ändern

STAPLETON (72) unterscheidet zwischen Faktoren, die a) vor, b) während und c) nach der Bestrahlung wirken:

a) Nach LACASSAGNE u. HOLWECK (78) wurde die Wirkung weicher Röntgenstrahlen erheblich herabgesetzt, wenn die Bakterien vor der Bestrahlung dem Tageslicht ausgesetzt wurden. In diesem Fall ginge im Bakterienleib wahrscheinlich eine Photoreaktion vor sich, die die Empfindlichkeit der Bakterien reduziere.

b) Schon 1941 machten ANDERSON u. TURKOWITZ (6) die Feststellung, daß die Anwesenheit von Sauerstoff den Bestrahlungseffekt erheblich vergrößert.

STAPLETON (72) errechnete eine Dosenreduktion um ungefähr 1/3 durch Verminderung der Sauerstoffkonzentration während der Bestrahlung (z. B. durch Einleiten von Stickstoff in die zu bestrahlende Bakterienaufschwemmung), unabhängig von dem verwendeten Bakterienstamm oder den Kultivierungsbesingungen.

ANDERSON (5) testete zwei Colistämme bei verschiedenen Strahlendosen auf ihre Empfindlichkeit in An- und Abwesenheit von Sauerstoff. Während der eine Stamm starke Unterschiede zeigte, blieb die Empfindlichkeit des zweiten Stammes nahezu konstant.

HOLLAENDER u. Mitarb. (64) fanden, daß Sauerstofffreiheit und chemische Schutzstoffe unter optimalen Bedingungen eine Strahlenschutzwirkung bis zu 98 % gewährleisten.

Der Sauerstoff wirkt nicht über eine Sensibilisierung der Bakterienzellen, sondern durch Vermehrung der mutagenen Substanzen während der Bestrahlung.

In HOLLAENDERs (65) Versuchen brauchten nämlich die unter aeroben Bedingungen gezüchteten und bestrahlten Colikeime zehnmal weniger Inaktivierungsenergie als die unter anaeroben Bedingungen gezüchteten und bestrahlten Keime.

Die Wirkung der Schutzsubstanzen im allgemeinen wurde schon beschrieben. HOLLAENDER u. STAPLETON (62) glauben, daß die Schutzwirkung bei Bakterien auf einer Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration durch die Schutzstoffe während der Bestrahlung beruht. Die gleichen Autoren (61) fanden auch eine Beziehung zwischen Sauerstoffwirkung und Temperatur während der Bestrahlung. Bei niedrigen Temperaturen war die Sauerstoffwirkung größer als bei höheren Temperaturen. Die Forscher sehen die Ursache dieses Phänomens in einer Beseitigung des Sauerstoffs durch endogene Respiration der Bakterien vor und während der Bestrahlung. Die Respiration hängt von der Stoffwechselaktivität der Bakterien und somit von der Temperatur ab.

STAPLETON u. Mitarb. (125) erklären damit auch die Abhängigkeit der Wirkung der Schutzstoffe von der Temperatur. Sie fanden nämlich bei

Bestrahlung von E. coli-Keimen, denen eine Schutzsubstanz (Succinylsäure) zugesetzt worden war, bei Eisbadtemperatur (2° C) keine Schutzwirkung, während bei Bestrahlung nach einer vorhergehenden Bebrütung von 30 min. bei 37° C eine auffallende Schutzwirkung festzustellen war. Bei Zusatz von respitationshemmenden Mitteln (z. B. Jodoacetate) wurde die Schutzwirkung aufgehoben. Dies läßt nach Ansicht der Autoren den Schluß zu, daß die Bakterien selbst den Sauerstoff beseitigen. Diese Oxydation des Sauerstoffs durch die Bakterien wird durch die wasserstoffübertragende, oxydationsfördernde Wirkung der Schutzstoffe erhöht (enzymatic reduction).

c) STAPLETON u. Mitarb. (126) bebrüteten bestrahlte Colikeime 12 Stunden lang bei 5 verschiedenen Temperaturen zwischen 6 und 37° C und fanden, daß sich bei 18° C die meisten Keime wieder erholten. Die Wirkung war die gleiche wie eine Herabsetzung der Bestrahlungsdosis um 30 %. STAPLETON (72) vermutet, daß hier ein synthetischer Prozeß wirkt, dessen Aktionsrate mit steigender Temperatur anwächst. Über ungefähr 18° C setzt ein destruktiver Prozeß ein, vielleicht eine steigende Thermolabilität einiger lebenswichtiger Systeme im Bakterium, der den Synthetisierungsprozeß überdeckt (sog. 'Fieberletalmutationen'). Daher hängt wohl auch die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme von der verschieden hohen Temperaturempfindlichkeit ihrer vitalen Systeme ab.

BERRIE (13) berichtet dagegen von einem bestrahlten Colistamm, dessen Überlebendenrate und Häufigkeit induzierter Mutationen im Vergleich zur Bebrütung bei 37° C bei 15° C stark reduziert wurde. Ähnliche Beobachtungen machten BILLEN u. WHITTLE (15), ebenfalls bei Colibakterien.

DURHAM u. WYSS (38) konnten eine verschieden große Wiederherstellung bei verschiedenen bestrahlten Bakterienkulturen in Beziehung bringen mit der Konzentration von anorganischen Salzen im Kultivierungsmedium. Sie ist nicht der Selektion resistenter Varianten zuzuschreiben, sondern einer Fähigkeit der Zelle, den Verlust von Nukleotiden nach der Strahlenschädigung zu verhindern.

HOLLAENDER u. STAPLETON (63) beschreiben die Wiederherstellung von bestrahlten Bakterien durch Zugabe von Milz- oder Hefeextrakt zum Nähragar. Als Schlüsselsubstanzen wurden Glutamin, Urazil und Guanin gefunden. Der prozentuelle Anteil der Mutanten gegenüber den Überlebenden

nahm auf diesen Spezialnährböden (im Vergleich zu Basisnährböden) ab. Die Autoren schließen daraus, daß die Bestrahlungseffekte nicht unmittelbar durch die Bestrahlung, sondern erst als Folge eines Stoffwechselprozesses innerhalb der bestrahlten Zelle entstehen, wenn diese durch spezielle Nährstoffe so ohne weiteres aufgehoben werden können. Schließlich beschreiben viele Wissenschaftler eine Photoreaktivierung nach der Bestrahlung durch sichtbares oder infrarotes Licht (THODAY 1942 (132), KELNER 1949 (70), NORMAN 1951 (103), ZELLE 1958 (148)). Nach NEWCOMBE u. WHITEHAED (102) wurde bei mittelstarker UV-Bestrahlung (500 erg/qm) und anschließender Infrarotbestrahlung von Bakterien der letale und der mutagene Effekt reduziert, bei hohen UV-Bestrahlungsdosen nur der Letaleffekt.

C. Die bakterielle Dissoziation

1. Begriffsklärung

DE KRUIF (76) prägte 1921 den Ausdruck 'bakterielle Dissoziation' für Variationen in Bakterienkulturen, die als relativ stabile, aber auch reversible Typen auftraten und sich gewöhnlich in mehreren Eigenschaften von ihren Ausgangsformen unterschieden.

Der Ausdruck Dissoziation geht auf Arbeiten um 1870 zurück, als eine scheinbare Aufteilung (Dissoziation) langer, fadenförmiger Bakterienzellstrukturen in kurze Körper und deren Rückführung in die alten Formen unter bestimmten Bedingungen beobachtet wurde.

BRAUN (19) versteht unter Dissoziation das Erscheinen zell- oder koloniemorphologisch unterschiedlicher Typen in Bakterienkulturen, die sich in verschiedenen Eigenschaften (z. B. Virulenz-, antigenen, biochemischen und Sensibilitäts-Eigenschaften) von ihren Eltern unterscheiden. Jede Bakterienart wächst normalerweise in einer bestimmten Form. Sie kann durch Induktion oder auch ohne nachweisbaren Grund in toto oder in einzelnen Exemplaren in eine andere Form übergehen und in dieser stabil bleiben, oder sie kann sich ebenso nach einiger Zeit in eine andere oder in eine der alten ähnliche Form verwandeln.

2. Die Typen der bakteriellen Dissoziation

BRAUN (19 u. 21) beschreibt die einzelnen Typen mit dem Hinweis, daß innerhalb der einzelnen Typengruppen wiederum unterschiedliche Formen auftreten können:

a) Die Glatt- oder S-(Smooth-)Form: In dieser Form wachsen die meisten Bakterien auf künstlichen Nährböden. Die Kolonien sind gewöhnlich rund und glänzend, die einzelnen Tochterzellen werden vom Kern der Kolonie aus gleichmäßig nach außen abgedrängt.

b) Die Rauh- oder R-(Rough-)Form: Dadurch, daß sich die geteilten Bakterienzellen nicht voneinander lösen, entstehen Bakterienketten. Bei der Koloniebildung krümmen sich die Zellen an den Teilungspunkten und geben so der Kolonie ein körniges, runzeliges Aussehen mit einer Tendenz zur Bildung irregulärer Ränder.

Durch den Verlust des spezifischen Polysaccharidoberflächenantigens (bei gramnegativen Bakterien des O-Antigens), haben die R-Formen verloren:

aa) Ihre artenspezifische Antigenität. Durch den Lipoidzuwachs an der Zelloberfläche nach Verlust des Polysaccharids agglutinieren die Varianten schon beim Kochen oder bei Zimmertemperatur in physiologischer NaCl-Lösung.

bb) Ihre Virulenz, die z. B. bei M-Formen durch Bildung von Toxinen in der Mukopolysaccharidkapsel als Schutz gegen Phagozyten gewährleistet war. Ausnahmsweise kommen dagegen Bacillus anthracis und einige hämolytische Streptokokkenarten auf den gebräuchlichen Nährböden nur als R-Formen vor und sind auch nur in dieser Form virulent.

cc) Ihre biochemische Aktivität, z. B. die Vergärung verschiedener Kohlehydrate.

Nach PAGE u. Mitarb. (105) müssen bei der Dissoziation in die R-Form nicht alle diese Eigenschaften verlorengehen. Die Autoren fanden, daß sich zwei R-Varianten von Salmonella typhimurium in ihrer Virulenz, ihrer Threoninempfindlichkeit und ihrer Koloniemorphologie deutlich voneinander unterschieden, obwohl sie die gleichen Antigene besaßen. BRAUN (19) schreibt dies einer Mutation an einem bestimmten Punkt eines gen-

kontrollierten Prozesses zu. So zeigt z. B. die Mutation am Punkt E in Abb. 2 nur Unterschiede in der Zell- und Koloniemorphologie, der Punkt G dagegen nur Unterschiede in der Koloniemorphologie.

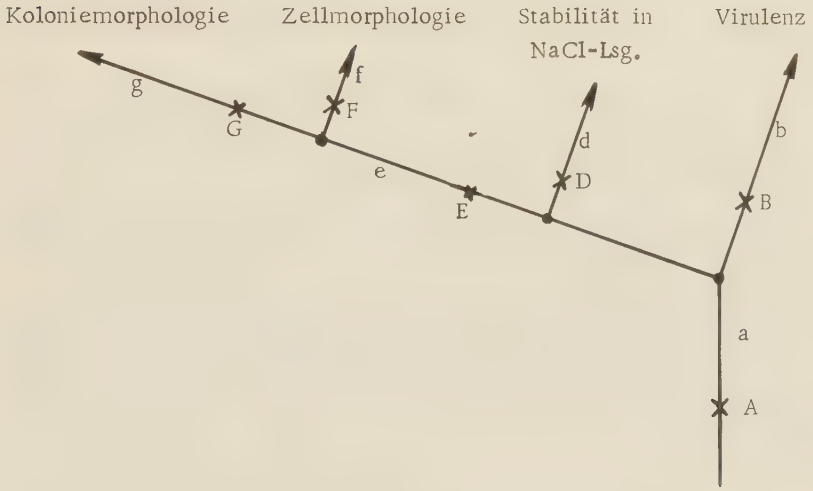

Abb. 2 (Aus BRAUN (19): Mutationen an verschiedenen Punkten des genetischen Materials)

c) Die M-(Mucoid-)Form: Die Kolonien sind rund, durchsichtig und von schleimiger Konsistenz. Die Bakterienzellen besitzen eine Schleimkapsel aus Mukopolysacchariden, die für die Virulenz verantwortlich ist. M-Formen kommen bei allen dissoziierenden Bakterien vor, interessanterweise bei Milzbrandbazillen nur innerhalb des lebenden Organismus. (Sie bilden hier als Schutzstoffe gegen die Phagozytose wahrscheinlich sog. Aggressine.)

d) I-(Intermediate-)Formen: Die Kolonien sind rund, undurchsichtig und leicht granuliert. I-Formen sind ziemlich unstabil und werden als Zwi-

schenformen zwischen S- und R- oder zwischen M- und S-Formen betrachtet. Man glaubt, daß es sich hier um Varianten mit einer verminderten Wirkung des Oberflächenantigens handelt.

e) G-(Gonidial-)Formen: Darunter sind winzige Kolonien zu verstehen, die häufig filtrierbare Elemente beinhalten.

f) D-(Dwarf-)Formen: Als solche bezeichnet man kleine (Zwerg-)Kolonien, die gewöhnlich diphtheroide Einschlüsse enthalten, über deren Wesen und Bedeutung jedoch noch sehr wenig bekannt ist.

g) L-(Lister-)Formen schließlich sind große, als sphärische Körper wachsende Kolonien, die plötzlich in kleine Sekundärkolonien zerfallen können, die wiederum Pleuropneumonia-like-organisms (sog. PPLO) enthalten. Penicillinhaltige Nährböden und ungünstige äußere Einflüsse begünstigen bei vielen Bakterienarten den Übergang in die L-Phase. Manche L-Formen gehen durch Bakterienfilter hindurch und bilden später wieder gewöhnliche Zellen und Kolonien.

3. Der Verlauf der Dissoziation

In festem Medium können Verschiedenheiten innerhalb einer Kolonie auftreten, z. B. R-Sektoren in einer S-Kolonie.

Im allgemeinen verläuft die Dissoziation von der M- über die S- nach der R-Form, manchmal aber auch in der Reihenfolge S-R-M (HENRY (58)), wobei viele Zwischenformen vorkommen können. Unter Laboratoriumsbedingungen hat sich die R-Form als die stabilste erwiesen.

BRAUN (20) konnte an Brucella abortus feststellen, daß S-Formen die höchste Wuchsrate (R-Formen eine weniger hohe, M-Formen die niedrigste) erreichen, daß R-Formen den höchsten Selektionswert haben und daß M-Formen die größte Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit besitzen (R-Formen eine weniger große und S-Formen eine sehr kleine). Auf Grund dieser Eigenschaften der einzelnen Typen ist also auch die Dissoziation von der S- über die R- nach der M-Form zu erklären.

Eigentliche Rückmutationen finden nach BRAUN (19) innerhalb der bakteriellen Dissoziation nicht statt. Bei der sog. 'Rückmutation' von der

R- zur S-Form handelt es sich bei letzterer nicht um die ursprüngliche S-Form, die zur R-Form geworden war, sondern um eine S-Variante, die sich von jener nur durch den höheren Selektionswert, der ja sogar über dem der R-Form liegt, unterscheidet. Es findet also in Wirklichkeit die Dissoziation S-R-S' statt.

4. Faktoren, die die Dissoziation begünstigen

Wenn sich nach BRAUN (19) zwei Bakterienstämme im zahlenmäßigen Auftreten von Varianten voneinander unterscheiden, so muß dies nicht einer unterschiedlichen Mutationsrate zugeschrieben werden, sondern kann a) von erblichen und b) von milieubedingten Faktoren abhängen.

a) DESKOWITZ (34) berichtet von einem mutablen Stamm von Salmonella typhimurium, der drei Jahre lang trotz dauernder Selektion der Varianten immer das gleiche Verhältnis von Varianten zum Originalstamm zeigte. Das Verhältnis konnte durch Abänderung der Umweltbedingungen verändert werden, bei Rückführung zu den Standardbedingungen war es jedoch wiederhergestellt. DESKOWITZ glaubt deshalb, daß die Variationen von einem bestimmten erblichen Mechanismus kontrolliert werden und daß der endgültige Prozentsatz der verschiedenen Typen das Ergebnis zweier Faktoren ist: erstens das Ergebnis der tatsächlichen genetischen Rate, mit der sich stabile und unstabile Zellen aufteilen, und zweitens das der relativen Wachstumsrate der Typen in einem bestimmten Medium.

Diese Ansicht wird von mehreren Verfassern (HOFFSTADT u. YOUMANS 1938, LOLOTOVSKY u. BUCHBINDER 1941, BRAUN1945 und 1946 (18) u. a.) bekräftigt.

BRAUN (18) konnte an Versuchen mit Brucella abortus beweisen, daß die Anzahl der fortpflanzungsfähigen Zellen in flüssigem Medium nur bis zu einem gewissen Maximum zunimmt, während die Gesamtzahl der Bakterienzellen ständig steigt. Der sog. Populationsdruck wird dann spürbar, wenn die Gesamtzahl der Zellen erheblich größer wird als die der fortpflanzungsfähigen Zellen. Dieser Populationsdruck wirkt dann wie ein Selektionsdruck, denn nun können sich Mutanten mit positivem Selektionswert, z. B. Zellen mit höherer Wachstumsrate oder höherer Fort-

pflanzungsfähigkeit als die Originalzellen entwickeln. Die Entstehung des Populationsdruckes ist aber sehr abhängig von den Umgebungsbedingungen, z. B. von der Güte des Nährbodens für den Originalstamm. Es zeigte sich nämlich, daß unter bestimmten, besonders günstigen Umgebungsbedingungen bei Brucella abortus keine Varianten erhalten werden konnten.

b) Als milieubedingte Faktoren betrachten BRAUN (18) und viele andere Autoren den veränderten pH-Wert im Medium, veränderte Temperaturen, Anwendung verschiedener Spezialnährböden oder erniedrigte Oxydations-Reduktions-Potentiale durch diverse schädigende Substanzen (z. B. LiCl) und ionisierende Strahlen. Die normalen Umgebungsbedingungen begünstigen meist nur die Entwicklung einer, am häufigsten der S-Form.

SEVAG (120) hat bewiesen, daß Lithiumchlorid (LiCl) die Enzyme hemmt, die für die Synthese des Kapselpolysaccharids verantwortlich sind. Dadurch werden die S-Formen unterdrückt und die R-Formen kommen auf.

Nicht nur gegen bestimmte Typen gerichtete Antisera, sondern gewöhnliches Blutserum von Mensch und Tier können die Dissoziation in eine andere Form, vor allem von der R- in die S-Form, bewirken (19). Der die R- und M-Varianten von Brucella abortus unterdrückende Blutfaktor wurde in der Gammaglobulinreihe des Blutplasmas gefunden (18).

Andererseits verhindern nach DICKINSON (36) gewisse organische Säuren die Variation als solche. So konnte bei Brucella bronchiseptica-S-Formen keine Dissoziation beobachtet werden, obwohl die Entwicklung von R-Formen in gemischten Kulturen (R- und S-Formen) durch die Säuren nicht beeinflußt wurde.

In gemischten R- und S-Kulturen konnten MOHR (96) und vor ihm schon andere Forscher gewisse 'assoziation factors' feststellen, die sich im Bakterium befinden. Mit diesen Faktoren kann eine Variante das Wachstum einer anderen entscheidend beeinflussen (v. a. hemmen). So stellten sich Salmonellakulturen, die R- und S-Formen in verschiedenen Prozentsätzen enthielten, nach längerem Wachstum in flüssigem Medium in ein immer gleich bleibendes Gleichgewicht ein, unabhängig von dem Verhältnis, in dem sie am Anfang gemischt wurden.

KONST (74) konnte nach dem Ausplatten von Paratuberkulosevarianten auf LONGs synthetic medium feststellen, daß S-Formen den Nährboden mehr

in den alkalischen, R-Formen das Medium mehr in den sauren Bereich überführt. Überhaupt kann in gemischten Kulturen durch Verschiebung des pH-Wertes eine Dissoziation in eine bestimmte Richtung, meist von der R- nach der S-Form erreicht werden.

ZAMENHOF (145) erklärt sich die Ursache des schlechten Wachstums gewisser Colivarianten in den als Gifte wirkenden und die Fortpflanzung der Nachkommen hemmenden Faktoren der Mutterzellen.

Nach Beobachtungen von ALEXANDER u. CACCHI (1) können auch andere Bakterienarten auf die Dissoziation eines bestimmten Stammes einwirken. Bei Zusammenbringen von Paratyphus-S-Formen mit Lactobacillus bulgaricus wuchsen erstere plötzlich nur mehr als R-Formen.

5. Das Wesen der Dissoziation

Beim Studium der bakteriellen Dissoziation wurden im Laufe der Zeit verschiedene Theorien über die Entstehung der Varianten entwickelt:

a) Die Mutationstheorie:

BEYJERINCK (14) hat schon 1901 als erster die Vermutung geäußert, daß das Phänomen, das später Dissoziation genannt wurde, Mutationen zuzuschreiben sei. Auch NEISSER 1906, MASSINI 1907, EISENBERG 1912 und 1914 und COLE 1916 neigten zu dieser Ansicht.

ZELLE (146) errechnete 1942 an einem unstabilen S. typhimurium-Stamm das spontane Wachstum einer R-Variante innerhalb von 148 Teilungen der S-Formen ohne vorherige Abänderung der Kulturbedingungen. Auf Grund vielfältiger Untersuchungen an den verschiedensten Bakterienarten fand er eine Spontanmutationsrate zwischen 10^{-2} und 10^{-10}.

Auch LINCOLN (34) fand, allerdings in Abhängigkeit von der Temperatur, Raten von 2×10^{-4} bis 3×10^{-7}. 1951 konnten LEDERBERG und Mitarb. (82) durch sorgfältige Analyse der genetischen Rekombination an E. coli K 12 einwandfrei das Vorkommen von Mutationen innerhalb der bakteriellen Dissoziation nachweisen.

BRAUN (19) setzt eine übergeordnete sog. 'basic'-Veränderung (Mutation), z. B. den genetischen Verlust eines Kapselpolysaccharids, voraus; als Aus-

druck dieser Veränderung können dann unter bestimmten Umgebungsbedingungen an die Mutation gekoppelte Eigenschaften als Variationen auftreten, z. B. Änderungen in der Koloniemorphologie, Virulenz, usw. Gewisse Dissoziationsformen wie die enzymatische Adaption und der oftmals ganz plötzlich auftretende Zellpleomorphismus (wahrscheinlich physiologische Modifikationen) kann BRAUN jedoch mit dieser seiner Theorie nicht erklären.

b) Die Adaption:

SEPPILLI (119) und MANWARNING (89) halten am Lamarckismus in der Bakteriologie fest. Ein ererbtes Potential einer genügend großen genetischen Wendigkeit erlaubt nach Meinung dieser Autoren den Bakterien eine direkte Anpassung an eine Vielzahl von Umgebungsbedingungen. Die S-Form verkörpert im einen Extrem die animalen, die R-Form die vegetativen Eigenschaften. PAUL (106) und MALLMANN (87) zählen die von ihnen beschriebenen Pseudo-R- und Pseudo-S-Formen, die nach Beseitigung der veränderten Umgebungsbedingungen wieder normale Kolonien bilden, zu den nicht-genetischen Modifikationen.

Auch HINSELHOOD (59) mißt (nichtgenetischen) Adaptionen eine große, wenn auch nicht ausschließliche Rolle zu.

SONNEBORN (122) schloß nach seinen Versuchsergebnissen bei antigenen Variationen und Transformationen auf das Vorhandensein und Wirken zytoplasmatischer Faktoren bei der Steuerung der Dissoziationsvorgänge. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von TIMAKOV (133) bemerkenswert. Dieser Forscher konnte nämlich erreichen, daß sich E. coli nach mehreren Passagen auf mit hitzegetöteten Salmonellen ergänztem Minimalagar langsam in Salmonellen umwandelten, die sich in nichts von den abgetöteten Keimen unterschieden.

c) Dauermodifikationen:

Nach JOLLOS (67) sind Dauermodifikationen durch die Umgebung induzierte, adaptive Modifikationen, die ohne Beziehungen zu erblichen Faktoren auch noch eine gewisse Zeit nach Beseitigung der Bedingungen, die die Änderungen induzierten, weiterbestehen.

MAYER (90), SEIFFERT (118) und später BRAUN (19) verwendeten folgende Gegenargumente gegen die Adaptions- und Dauermodifikationen-Theorie:

1.) Das Fehlen eines direkten Zusammenhanges zwischen spezifischen Umweltbedingungen und dem Variantentyp;
2.) das Erscheinen von ganz verschiedenen Varianten unter gleichen Umweltbedingungen;
3.) das Erscheinen von Reversionen unter gleichbleibenden Umweltbedingungen;
4.) verschiedene umgebungsbedingte Agens können die gleichen Varianten erzeugen.

d) Lebenszyklen:

ENDERLEIN (40) und MELLON (94) prägten den Begriff der 'cyclogenetic-' oder 'ontogenetic-theory', der den Bakterien die Fähigkeit zusprach, durch richtiggehende Lebenszyklen nach Art der parasitischen Protozoen zu geben.

HADLEY (54) u. (55), der härteste Verfechter dieser Theorie, sieht die einzelnen Varianten in der Richtung G-I-M-S-R als Stationen eines Lebenszyklus an, wobei jede dieser Stationen von den jeweiligen Umweltbedingungen abhängig sein soll. Die G-Form ist als eine Jugendform, die R-Form als eine Alterungsform dieses Zyklus anzusehen. Die Varianten werden 'Kulturphasen' genannt. DUFF (37) erhielt durch eine besondere Behandlung von Salmonellen ausgehend von der S-Form die G-Form über die R-Form und indem er aus der G-Form wieder die R- und die S-Form züchten konnte, schloß sich seiner Meinung nach der Kreis dieses angenommenen Zyklus.

Als Gegenargumente brachten BRAUN (19) u. a. vor:

1.) Das häufige Fehlen von 'Nachkommen' der sog. 'Kulturphasen';
2.) die verschiedene Reihenfolge im Auftreten der Varianten;
3.) das Erscheinen von Varianten unabhängig von den Umgebungsbedingungen.

D. Zwergkolonien

(Small-Colony-Variants: SCV)

1. Spontan entstandene SCV

1910 beschrieb JACOBSEN (66) als erster das Wachstum kleiner Kolonien auf Conradi-Drigalski-Agar bei der Untersuchung einer Typhusepidemie in Dänemark. Nach ca. 2 - 3 Tagen Bebrütung entstanden plötzlich wieder normalgroße Kolonien, die sich in nichts von den gewöhnlichen Typhuskeimen unterschieden. Die Zwergkolonievarianten, die Bakt. typhi mutabile genannt wurden, zeigten dagegen verspätete Säuregärung in Mannitbouillon und geringe Agglutinabilität. Durch Zusatz verschiedener anorganischer Salze ($Na_2S_2O_3$, SO_2, Na_2SO_3 u. a.) zum Nährboden wurde die Wachstumshemmung aufgehoben. JACOBSEN schrieb diese Wuchshemmung der Bildung toxischer Stoffe durch das Autoklavieren zu.

FROMME (46) berichtete 1911 von einem atypischen Typhusstamm bei einer 49jährigen Frau, der ein auffallend gehemmtes Wachstum auf den gebräuchlichen Nährböden, außer auf Endo-Agar, zeigte. Natriumsulfit hob die Hemmung völlig auf. Im Gegensatz zu dem von Jacobsen isolierten Stamm agglutinierte dieser Stamm gut in Typhusantiserum und es wurden keine 'Rückmutationen' zu großen Kolonien beobachtet.

Von KRISTENSEN u. KAUFFMANN (75) wurde 1935 eine SCV-Variante von einem normalen S. eastbourne-Stamm erhalten, die unter anaeroben Verhältnissen wuchs und die Indol bildete.

Beim Ausplatten 2 - 5 Monate alter Shigellen auf Nähragar fand CHINN (24) 1936 bis zu 1% Zwergkolonien. Diese zeigten geringe biochemische Aktivität und langsames Wachstum. Je größer die Kolonien waren, desto höher war auch der Titer der Agglutination in normalem Antiserum. Reversionen zu großen Kolonien und normalen Eigenschaften wurden häufig beobachtet.

Bei einem Laboratoriumsstamm von S. paratyphi B beobachtete HADDOW (52) 1938 das Vorkommen von Zwergkolonien, die den von HADLEY beschriebenen G-Typen ähnelten. Eine Reversion erfolgte nicht, es entwickelten sich aber während der weiteren Züchtung eine Anzahl von nahe verwandten Varianten.

1941 konnten MORRIS u. Mitarb. (98) aus Faeces, Blut, Urin und Sputum von Menschen Zwergkoloniestämme von S. typhi isolieren.

SCHNITZER u. Mitarb. (116) stellten 1943 an spontan entstandenen Zwergkolonievarianten von Staphylokokken eine starke Resistenz gegen Penicillin fest.

Von MORRIS u. Mitarb. (97) wurde 1943 der Ausbruch der Typhuskrankheit durch eine Zwergkolonieform von S. typhosa beschrieben.

MORTON u. SOMMER (99) beobachteten schließlich auch das spontane Auftreten von Zwergkolonievarianten bei hämolytischen Streptokokken.

2. Induzierte Zwergkolonieformen

KUHN u. STERNBERG (77) erhielten 1931 von verschiedenen Bakterienarten SCV durch Zugabe von Ammoniak oder Phenol zum Nährmedium. Die Wirkung des Ammoniaks war allerdings nur eine vorübergehende.

Die von HADLEY u. Mitarb. (56) 1931 durch Behandlung mit LiCl erhaltenen SCV von Shigellaarten gingen durch bakteriologische Filter hindurch und unterschieden sich in nutritiven, fermentativen und serologischen Eigenschaften von dem Originalstamm. Diese Formen nannte HADLEY G-Organismus.

SWINGLE (131) konnte 1935 gewisse Fermentationsverluste bei mit Hilfe von LiCl erhaltenen Staphylokokken-SCV feststellen, es gelang jedoch nicht, antigene Unterschiede festzustellen oder die Bakterien durch Filter hindurchzubekommen.

Bei den von YOUMANS (143) 1937 und 1942 mit anorganischen Salzen, z. B. LiCl, BaCl und 1945 mit Penicillin erhaltenen SCV von Staphylococcus aureus war ebenfalls der Verlust fermentativer Fähigkeiten festzustellen. YOUMANS schreibt diesen einer erniedrigten Stoffwechselrate der Bakterien als Antwort auf die hemmende Umgebung zu.

Die von DUFF (37) mit Hilfe von 1% LiCl erhaltenen Salmonella-SCV waren im Durchmesser 0,1 - 0,3 mm groß, bildeten kein Pigment, vergoren Glukose, Maltose und Mannit nicht und waren nicht pathogen.

COLWELL (26) erhielt durch Behandlung von E. coli mit 2-methyl-1,4-naphthochinon stabile Zwergkolonien, die 1/6 bis 1/10 so groß wie die Elterntypen waren, gewisse Fermentationsverluste und in flüssigem Medium sehr zahlreich Reversionen zum Originaltyp zeigten.

Nach BRAUN (19) erzeugen subletale Konzentrationen von antibakteriellen Agens (z. B. BaCl, Phenol, Penicillin, Sulfonamide u. a.) spezifische selektive Bedingungen, unter denen SCV mit steigender Resistenz gegen diese Stoffe entstehen. Es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach um echte Mutanten mit erblich erniedrigtem Stoffwechsel, der das Überleben unter ungünstigen Wachstumsbedingungen erlaubt.

RYAN und SCHNEIDER (113) und DAVIS (31) berichteten als bisher einzige Autoren 1949 von bestrahlten Colikeimen, die im Gegensatz zu unbestrahlten Keimen der selben Bakterienstammkultur auf Minimalmedium Mikrokolonien bildeten. Es zeigte sich (113), daß die Mikrokolonien histidinauxotroph waren, denn nach Zugabe von Histidin zum Nährboden wuchsen die SCV wieder in normaler Größe, und daß das Minimalmedium Spuren von Histidin enthalten hatte, das den Kolonien nur ein geringes Wachstum (als Mikrokolonien) erlaubt hatte.

HALE (57) erhielt 1949 auf einem gentianaviolettenthaltenden Nährboden eine G-Variante von Staphylokokkus aureus. Als wachstumsfördernder Faktor wurde Urazil gefunden. HALE vermutete deshalb, daß die Urazilsynthese durch Gentianaviolett gehemmt wurde.

WEINBERG (138) beimpfte 1950 einen mit 1% LiCl versehenen Nähragar mit neun verschiedenen Bakterienarten und erhielt von allen Stämmen nach zweitägiger Bebrütung bei 37° C Zwergkolonien mit einem Durchmesser unter 0,15 mm. Wenn auch gelegentlich einige Zellen die Fähigkeit zurückerhielten, große Kolonien zu bilden, so ergab doch im großen und ganzen die wiederholte Subkultur der SCV in 12 Monaten keine Änderung in Größe, Morphologie und Erscheinungszeit der Kolonien. Fünf Stämme waren gegenüber verschiedenen Faktoren (Thiamin, Thiamin und Vitamin B 12, Reticulogen, Hefeextrakt, Kalbfleischbrühe) auxotroph. Alle neun SCV bildeten nach Beigabe der mangelnden Substanz zum Nährboden große, braune Kolonien, während die Zwergkolonien selbst und auch die Elternstämme weiße Kolonien bildeten.

MITCHELL u. HONLAHAN (95) hatten schon 1946 bei Zugabe von Adenin zu einer Adenin-Mangelmutanten die Bildung eines purpurnen Pigmentes beobachtet. Die Autoren betrachten das Pigment als ein Stoffwechselprodukt, das sich als Ergebnis einer genetischen Blockierung der Adeninsynthese anhäuft.

1951 beschrieb VOUREKA (135) eine SCV von E. coli, die mit Chloramphenicol und spezifischem Antiserum isoliert werden konnte und sich nur durch ihre Antibiotikaempfindlichkeit von dem Elternstamm unterschied.

EPHRUSSI u. HOTTINGER (42) erhielten 1951 SCV (sog. petites) bei Hefen durch Zugabe von Acriflavin. Nach Ansicht der Autoren behindert Acriflavin die Autokatalyse von cytoplasmatischen Faktoren und damit die von diesen kontrollierten Atmungssysteme. Die Folge sei daraufhin eine Reduktion der Atmung und die Bildung der stabilen SCV!

Den Mangelmutanten Weinberg's sehr ähnliche SCV beschrieb GILLESPIE 1952 (48).

VOUREKA (136) konnte 1952 an Staphylokokken-SCV, die durch Behandlung mit Chloramphenicol erhalten worden waren, die Selektion von Spontanmutationen ausschließen. Die Varianten zeigten Verlust der biochemischen Tätigkeit, der Phagenempfindlichkeit und der Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol.

MANTEN u. ROWLEY (83) erzeugten 1953 mit Chloramphenicol und normalem Blutserum bei E. coli SCV, die sich nur durch ihre Antibiotikaempfindlichkeit von dem Originalstamm unterschieden.

WISE u. SPINK (139) beobachteten bei Staphylococcus aureus SCV in vitro durch Zusatz verschiedener Antibiotika zum Nährboden und in vivo bei Isolation von Keimen kranker Menschen, die mit Antibiotika behandelt worden waren.

Stabile SCV erhielten WEED u. LONGFELLOW (137) 1954 nach Behandlung von E. coli mit niedrigen Konzentrationen von Kupferionen ($CuSO_4$). Die Selektion von Spontanmutanten konnte weitgehendst ausgeschlossen werden, denn es wuchsen ca. 150 Zellen einer Population zu SCV (mit

1/6 bis 1/10 der Größe normaler Kolonien) heran. Die Varianten, die allein durch die induktive Wirkung des $CuSO_4$ entstanden, zeigten Unterschiede in der Vergärung von Glukose und Laktose und im Nukleinsäurestoffwechsel und waren gegenüber UV-Bestrahlung resistenter als der Elternstamm.

Auch CLOWES u. ROWLEY (25) konnten 1955 durch Behandlung von E. coli K-12 mit verschiedenen $CuSO_4$-Konzentrationen in Minimalmedium nach Ausplattung auf Nähragar Zwergkolonien mit einem Durchmesser von 0,75 bis 1 mm gewinnen. Die Varianten wurden den verschiedensten Prüfungen unterzogen, sie zeigten jedoch weder nutritive, fermentative oder serologische Unterschiede, noch Unterschiede in der Coliphagenempfindlichkeit. Der einzige Unterschied war ihre geringere Wachstumsgeschwindigkeit in flüssigem Medium und auf den meisten festen Nährböden und wurde als Mutation einiger unspezifischer Faktoren (z. B. Nachlassen der Zellwandpermeabilität) angesehen.

STOKES u. BAYNE (128) machten in diesem Zusammenhang 1957 interessante Feststellungen an verschiedenen Salmonellastämmen. Bei den Versuchen zeigte sich, daß vor allem S. pullorum auf den meisten Nährböden sehr langsam wächst und gegenüber Temperatur- und pH-Schwankungen empfindlicher ist. Nur 1 - 2% Hefeextraktzusatz zum Nähragar erhöhte das Wachstum um ein vielfaches. Als Grund des langsameren Wachstums von S. pullorum wurde eine Verlängerung der Ruhephase (lag-phase) und eine geringere Multiplikationsrate während der Wachstumsphase (logarithmicphase) angenommen.

1958 isolierten STOKES u. BAYNE (127) von zehn Salmonellastämmen SCV, nachdem sie diese 1 - 2 Wochen lang im Nährbouillon mit 1% Lithiumsulfat- oder 1% Natriumselenitzusatz bei 35° C bebrütet hatten. Auf Trypticase-Soja-Agar hatten die Zwergkolonien 1/3 der Größe der normalen Kolonien; die Zahl der Zellen pro Zwergkolonie war nur 1/50 so groß wie die der normal großen Kolonien. Wurden die Varianten in Subkulturen ausgeplattet, so wuchsen kleine und große Kolonien, wobei die großen stark in der Überzahl waren. Stabile SCV-Stämme wurden durch wiederholte Reisolationen von Zwergkolonien erhalten. Die Varianten zeigten alle eine langsamere Fermentation der Kohlenhydrate und eine langsamere Oxydation der Aminosäuren. Einige Stämme waren gegenüber ver-

schiedenen Aminosäuren (vor allem Zystein) in Verbindung mit Vitamingemischen auxotroph geworden. Die Autoren bezeichnen die SCV als faktorabhängige Mutanten. JACOBSENs Annahme, daß durch das Autoklavieren der Nährmedien toxische Substanzen entständen, sei unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen; möglich sei eher die Zerstörung des Zysteins im Trypticase-Soja-Agar, da Zystein die toxische Wirkung z. B. des Selens neutralisiert. SHIFT (121) und COWIE u. COHEN (28) konnten nämlich nachweisen, daß Selenium sich in den Schwefelstoffwechsel einmischen und durch Substitution toxische Selenanalogons von Aminosäuren bilden kann.

Auch NORTH u. BARTAM (104) konnten durch Zugabe von kleinen Mengen Zystein zu Selenit-Nähragar das Wachstum von Salmonella typhimurium stimulieren.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material

1. Bakterienstammkultur

Für die Untersuchungen wurde der Stamm Salmonella typhimurium (BRESLAU S) aus der Sammlung des Tierhygienischen Instituts verwendet, der vor ungefähr 7 Jahren an der Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Schleißheim/Obb. als besonders virulenter Stamm unter der Bezeichnung S. enteritidis Breslau S isoliert worden war.

2. Zur Bestrahlung der Bakterien verwendete Petrischälchen

Die kleinen Petrischälchen hatten einen oberen Durchmesser von 5,9 cm, einen unteren Durchmesser von 5,5 cm und somit eine ungefähre Bodenfläche von 23 qcm. Die Stärke der Seitenwände war 2,5 mm, die des Bodens 3,5 mm. Die Schichthöhe nach Einfüllen von 2 ccm Flüssigkeit war ungefähr 1 mm.

3. Nährmedien

a) Als gebräuchliche Nährmedien wurden verwendet:
Nährbouillon und
Peptonwasser (1% Pepton-Witte, 0,5% NaCl), die durch dreimaliges Sterilisieren (1 Stunde im Dampftopf) keimfrei gemacht worden waren.
Nähragar (Verdauungsagar),
Tryptoseagar (Difco) und
Mc. CONKEY-Agar (Difco) (91); diese standardisierten Nährböden wurden nach dem Ausgießen in Petrischalen einen Tag lang im Brutschrank gehalten, danach auf Keimfreiheit untersucht und im Eisschrank bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

b) Besondere Nährmedien:
Minimalmedium: 1 l Minimalmedium enthielt, in destilliertem, keim-

freien Wasser gelöst, 1% Glukose. 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% Natriumzitrat • 2 H_2O, 0,05% $MgSO_4$ • 7 H_2O und eine 1/20 molare Phosphatpuffer-Lösung mit pH 7.

Die sog. 'Bunte Reihe': Die Kohlenhydrat-Indikator-Lösung nach KAUFFMANN (69) bestand aus einer Stammlösung, einer Indikatorlösung und dem jeweiligen zu testenden Kohlenhydrat. Die Stammlösung enthielt 5 g Liebig's Fleischextrakt, 10 g Pepton (WITTE), 5 g NaCl und 1000 ml Wasser. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Als Indikator wurden pro Liter Stammlösung 12 ml einer Bromthymolblau-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet: 1 g Bromthymolblau, 25 ml einer 1/10 normalen NaOH und 475 ml Wasser. Darauf wurde zu den beiden Lösungen 5 g (= 0,5% des zu testenden Kohlenhydrates zugegeben. Nach dessen Auflösung im Dampftopf wurden je 4 ccm der fertigen Lösung in Reagenzgläser abgefüllt und diese 3 mal 30 Minuten lang im Intervall von jeweils 24 Stunden sterilisiert. Getestet wurden:
die Pentosen Arabinose, Xylose und Rhamnose;
die Hexosen Dextrose und Maltose;
die mehrwertigen Alkohole Mannit, Dulzit, Sorbit und Inosit.

In die Reagenzgläser mit Dextrose und Mannit wurden zur Feststellung der Gasbildung Glasröhrchen (sog. DURHAM-Röhrchen) mit der Öffnung nach unten eingelegt.

Minimal-Agar: Zu dessen Herstellung wurden 2% besonders gereinigten (entvitaminisierten) Spezialagars (Special-Agar-Noble, Difco) dem Minimalmedium zugesetzt.

Ammon-Agar: Das Ammon-Substrat nach HOHN u. HERMANN (59), ein besonders nährstoffarmer Agarnährboden mit nur einer Stickstoffquelle, wurde hergestellt aus: einer Salzlösung mit 1,5 g $Na(NH_4)HPO_4$, 1 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4$ und 1000 ml aqua dest. und 20 g (= 2%) Fadenagar, der 2 Tage lang in destilliertem Wasser, das mehrmals erneuert wurde, gewässert wurde. Nach 2 Tagen wurde der Fadenagar mit dem Schaumlöffel ausgequetscht und mit der Salzlösung im Autoklaven verflüssigt und gelöst. Nach Filtration durch Watte wurde die Agarlösung in Flaschen zu 200 ccm abgefüllt, der pH auf 7 eingestellt und sterilisiert. Vor dem Erkalten wurden 200 mg des zu testenden Kohlenhydrates (Dextrose, Arabinose, Dulzit) bzw. 250 mg Natriumzitrat und je 2 ccm einer 1,5%igen alkoholischen Bromthymolblaulösung zugegeben. Dann wurden

je 7 ccm davon in Reagenzgläser abgefüllt, 3 mal 30 Minuten im Dampftopf sterilisiert und zum Erkalten schräggestellt. Die Farbe des Nährbodens war olivgrün.

Hefeextrakt-Agar: In 1 Liter Leitungswasser wurden 25 g Agar-Agar eingeweicht und danach 25 g kochsalzhaltigen Hefeextraktpräparates 'Bacteriozym' (der Fa. Zyma-Blaes AG. München) zugesetzt. Das Gemisch wurde eine halbe Stunde im Autoklaven sterilisiert und dann in Petrischalen ausgegossen.

Tryptose-Tetrazolium-Agar: Er wurde in drei verschiedenen Verdünnungsstufen des 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC) hergestellt, nämlich in den Verdünnungen 1 : 2500, 1 : 5000 und 1 : 10000. Es wurde zuerst die Tetrazoliumlösung hergestellt und dann das Tryptoseagarpulver zugesetzt.

B. Methodik

1. Verdünnung und 'Waschen' von Bakteriensuspensionen

Die Verdünnung bestimmter Bakteriensuspensionen wurde mit 0,85%iger NaCl-Lösung in Schüttelflaschen mit Gummistopfen vorgenommen. Zuerst wurde 1 ccm der Suspension in 99 ccm NaCl-Lösung gebracht, also eine Verdünnung 1 : 100 hergestellt. Diese wurde z. B. bei unbestrahlten Keimen mit A-3 (= 10^{-3} Keime) bezeichnet, weil von Anfang an das Ausspateln von 0,1 ml mit einbezogen wurde. Die unverdünnte Aufschwemmung führt also schon die Bezeichnung A-1. Die weitere Verdünnung wurde durch Übertragen von 1 ccm in 9 ml NaCl-Lösung usw. vorgenommen.

Damit z. B. bei Überimpfung der Bakterien von Bouillon auf Minimalmedium möglichst keine Bouillonbestandteile überimpft werden konnten, wurden die Keime 'gewaschen', d. h. 5 Minuten bei 6000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert und die sedimentierten Bakterien nach Zugabe von 5 ccm Phosphatpuffer (1/15 molare Na_2HPO_4- und KH_2PO_4-Lösung bei pH 7,168) 8 Minuten im

Schüttelapparat geschüttelt. Diese Manipulation wurde noch einmal wiederholt.

2. Bestrahlung der Bakteriensuspensionen

Bestrahl wurde mit einem Siemens-Dermopangerät, das bei einer Spannung von 50 kV, einer Stromstärke von 25 mA und einem Focus-Objekt-Abstand (FOA) von 10 cm eine Oberflächendosisleistung von 30 000 Röntgen/min. hatte.

Das 'Bestrahlungs'-Petrischälchen wurde mit Hilfe eines Winkels genau unter das Strahlenaustrittsfenster (Focus) der Röntgenröhre im FOA von 10 cm gestellt und eine Markierung für die nachfolgenden Bestrahlungen angebracht. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde das Deckglas von dem Petrischälchen genommen. Jedes Schälchen wurde 2, 5 min. lang, also mit insgesamt 75 000 Röntgen-Oberflächendosis bestrahlt.

3. Kulturverfahren

Zur Überimpfung von Bakterien aus festem in flüssiges Nährmedium wurde eine Öse leicht in eine Einzelkolonne getaucht, und die Bakterienmasse in flüssigem Nährmedium verteilt.

Bei Überimpfung von flüssigem auf festes Medium wurden sterile 0, 1 ml Pipetten verwendet. Der Inhalt der Pipette wurde auf die Agaroberfläche gebracht und die Flüssigkeit mit sterilen Drigalski-Spateln gleichmäßig auf dem Agar verrieben.

Feste beimpfte Nährmedien wurden bis zu 6 Tagen, flüssige bis zu 8 Tagen bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

4. Besichtigung der Kolonien

Die Koloniemorphologie wurde mit Hilfe des Plattenmikroskops (Fa. Wild, Heerbrugg) bei 6-, 12-, 25- und 50facher Vergrößerung beurteilt. Die Kolonien wurden im Auflicht und bei Durchleuchtung beobachtet.

Es wurde die Schrägbeleuchtungsmethode nach HENRY (57) angewandt. Dazu wurde in meinen Versuchen ein Spiegel so vor das Plattenmikroskop gelegt, daß die von einer Bogenlampe auf ihn einfallenden Lichtstrahlen genau in einem Winkel von 45 Grad von unten her auf die Agarplatten (nach HENRY am besten Mc. CONKEY-Agar) auftrafen. Veränderte bezw. Zwerg-Kolonien wurden auf der Außenseite der Petrischale mit dem Fettstift gekennzeichnet und daraufhin mit der Tuschefeder numeriert. Die Größe (Durchmesser) der Kolonien wurde mit Hilfe eines Okularmikrometers festgestellt.

5. Besondere Verfahren zur Erkennung koloniemorphologischer Varianten

a) Mikrokolonien nach SCHNEWEIS (115): Aus einer zwei Stunden bebrüteten Bakterienkultur in Nährbouillon wurden mit einer sterilen Schreibfeder 12 kleine Tröpfchen nebeneinander auf ein Deckglas gebracht. Dieses Deckglas wurde so auf einen Hohlschliffobjektträger aufgesetzt, daß die Tröpfchen in dem durch den Hohlschliff bedingten Raum unverändert erhalten blieben. Zur Verhinderung der Verdunstung wurden die Ränder des Deckglases mit Wachs luftdicht abgeschlossen. Die Tröpfchen und die bald darin entstehenden Mikrokolonien wurden bei 37° C bebrütet und stündlich (für 24 Stunden) unter dem Mikroskop betrachtet. SCHNEWEIS (115) konnte auf diese Weise koloniemorphologisch und mikroskopisch nicht feststellbare R-Formen identifizieren.

b) Färbung der Kolonien mit Kristallviolett nach ULBRICH (134): Verwendet wurde eine wässerige Kristallviolettlösung in der Verdünnung 1 : 2 000. Die Agarplatten wurden vorsichtig mit der Farblösung überschichtet; nach 20 sec. wurde sie wieder vorsichtig abgegossen und die Platten auf Veränderungen untersucht. Nach ULBRUCH (134) färben sich S-Formen blau, R-Formen jedoch kräftig rot.

6. Agglutination

Auf einem Objektträger wurde mit der Öse möglichst viel Koloniemasse einer jungen (20 Stunden bebrüteten) Schrägagarkultur trocken zerrieben und nur langsam von der die Agglutination bewirkenden Flüssigkeit zugegeben, um Klumpenbildung zu vermeiden. Zur Agglutination verwendet

wurden: 0,85% und 3,5%ige Kochsalzlösung, 0,1% und 0,2%ige Trypaflavinlösung und spezifische Salmonella-Faktorenseren der Fa. Behring-Werke, und zwar die O-Antiseren O-4 und O-5 gegen die Körperantigene und die H-Antiseren H-i und H-2 gegen das spezifische und das unspezifische Geisselantigen (Antigenstruktur von S. typhimurium (Breslau S): O-4, O-5, H-i, H-1, H-2).

C. Versuche und Versuchsergebnisse

1. Vorbehandlung und Bestrahlung der Bakterien

Vom Schrägagar wurden S. enteritidis-Keime auf zwei Nähragarplatten überimpft und 10 Stunden bebrütet. Von jeder Platte wurde eine Einzelkolonie in je 5 ccm Nährbouillon gebracht und 16 Stunden bebrütet. Danach wurde aus jedem Bouillonröhrchen 2 x 0,06 ccm in 4 mit je 10 ccm Peptonwasser gefüllte Reagenzgläser überimpft.

Nach 4 Stunden Bebrütung wurden aus den 4 Proben je 2 ccm leichtgetrübtes Peptonwasser in 4 besonders gekennzeichnete 'Bestrahlungs-Petrischälchen' gebracht und mit 75 000 Röntgen Oberflächendosis bestrahlt.

Die Verdünnung der zum Vergleich benutzten unbestrahlten Bakterienaufschwemmungen (Proben aus allen 5 Peptonwasserkulturen) wurde zur Zeit der Bestrahlung vorgenommen. Durch Vorversuche war eine Verdünnung von 1 : 100 000 (= Überlebendenrate von 10^{-5} bei Bestrahlten) als die im Vergleich zu bestrahlten Keimen richtige Konzentration gefunden worden.

2. Züchtung auf festen Nährmedien

a) Unmittelbar nach der Bestrahlung bzw. Verdünnung wurden ausgespatelt:

Nährmedium	unbestrahlte Keime		bestrahlte Keime	
	Anzahl der Platten	Kennzeichen	Anzahl der Platten	Kennzeichen
Hefeextraktagar	40	A-5	40	B-1
Verdauungsagar	8	V-5	9	V-1
Tryptoseagar	6	T-5	6	T-1

b) Sofort nach der Impfung kamen alle Platten in den Brutschrank, außerdem drei unbeimpfte Kontrollplatten (1 Hefeextrakt, 1 Verdauungs-, 1 Tryptose-Agar). Sie sollten nach viertägiger Bebrütung wie beimpfte Platten zeigen, ob der Nährboden nach einigen Tagen ausgetrocknet war, so daß dann kein Wachstum mehr stattfinden konnte, obwohl in der Umgebung genügend Ausbreitungsraum und Nährstoffe zur Bildung oder Vergrößerung der Kolonien vorhanden waren.

So wurden nach 4 Tagen Bebrütung Zwergkoloniesubkulturen (2) und Kontrollen (1) auf diesen Platten ausgespatelt. Nach 24stdg. Bebrütung wuchsen normale Kolonien in gleicher Größe wie auf frisch hergestellten Agarplatten.

3. Beobachtung der wachsenden Kolonien unbestrahlter Keime

a) Für die Versuche waren durch Verunreinigung unbrauchbar geworden: 4 A-5, 2 V-5 und 1 T-5-Platten. Übrig blieben insgesamt 47 Platten.
b) Anzahl der Kolonien pro Platte: Siehe Tabelle 1.
c) Durchschnittliche Größe der Kolonien: Siehe Tabelle 2.
d) Auftreten von Zwergkolonien.
Nach 24 Std. Bebrütung waren auf den in Tabelle 3 aufgeführten Platten Zwergkolonien aufgetreten: Siehe Tabelle 3.
Alle diese Zwergkolonien waren jedoch nach 3 Tagen Bebrütung weit über die maximalste Zwergkoloniegröße hinausgewachsen.

4. Beobachtung der wachsenden Kolonien bestrahlter Keime

a) Durch Verunreinigung unbrauchbar gewordene Platten:
11 B-1, 5 V-1 und 1 T-1-Platten. Übrig blieben insgesamt 38 Platten.
b) Durchschnittliche Größe unveränderter Kolonien: Die meisten Kolonien hatten die Größe und das Aussehen unbestrahlter Bakterienkulturen (siehe Tabelle 2). Auch mit der HENRY'schen Beleuchtungstechnik konnten keine Besonderheiten in der Koloniebildung festgestellt werden.
c) Die Erkennung und mehrtägige Beobachtung von Zwergkolonien: Die Zwergkolonien (Zk.) entstanden nicht alle gleich nach 24 Stunden Be-

brütung. Tabelle 4 zeigt, daß sogar 5 Tage nach Beimpfung der Platten noch Zk. entstehen können. Viele Zk. nahmen vom Tag ihrer Entstehung an noch etwas an Größe und Umfang zu. Die Zk., die über eine Durchmessergröße von 0,45 mm hinaus wuchsen, wurden nicht mehr als Zk. betrachtet und deshalb in Tabelle 4 auch nicht mitgezählt (bzw. in Tabelle 5 in Klammern gesetzt).
Tabelle 4 zeigt das Wachstum von Zk. und ihre Größe in mm. Die in Spalte 3 numerierten Zk. wurden für die späteren Versuche isoliert.

d) Vergleich normal großer Kolonien mit den Zwergkolonien: Tabelle 5 zeigt die Anzahl normaler Kolonien und der Zk. pro Platte. Die in Klammern stehenden Zahlen in Spalte 4 zeigen anfängliche Zk. an, die über die Zk.-Maximalgröße von 0,45 mm hinauswuchsen.

TABELLE 1

Anzahl unbestrahlter Kolonien pro Platte

A-5 insgesamt 36 Platten			V-5 insgesamt 6 Platten	T-5 insgesamt 5 Platten
478	535	606	330	512
486	542	614	519	550
492	544	622	532	561
496	554	624	554	607
497	555	626	554	620
505	561	643	580	
510	566	650		
516	568	652		
516	582	652		
519	600	674		
531	606	680		
534	608	731		

TABELLE 2

Durchschnittliche Größe der Kolonien unbestrahlter Keime (in mm)

Anzahl der Kolonien pro Platte	nach 24 Std. Bebrütung			nach 4 Tg. Bebrütung		
	durchschnittl.	von	bis	durchschnittl.	von	bis
zw. 400 und 500	2,55	0,95	5,95	2,75	1,0	6,25
zw. 500 und 600	1,7	0,8	5,1	1,85	0,95	6,25
zw. 600 und 700	1,7	0,75	5,0	1,75	0,80	5,9
über 700	1,6	0,7	5,0	1,7	0,7	5,5

TABELLE 3

Zwergkolonien bei unbestrahlten Keimen

Kennzeichen	Kolonienzahl pro Platte	Zahl der Zwergkol.	Größe der Zwergkolonien in mm		
A-5	643	3	0,43	0,34	0,34
A-5	650	2	0,51	0,43	
T-5	620	1	0,34		

TABELLE 4

Beobachtung der Zwergkolonien und ihre Größe in mm

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkolonien; nach Tg. Bebrütg.					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B1/1	1		0,35					
1	2		0,17	-	0,26	-	0,42	
1	3		0,34	-	-	-	0,39	
1	4		-	0,16	-	-	0,26	
1	5	1	-	-	0,17	-	0,25	
2	6		0,15	-	0,34			
2	7		0,26	-	0,35			
2	-		0,35	0,51				
2	8	2	0,16					
3	9		0,17					
3	-		0,34	-	-	0,6		
3	10		0,15	-	-	0,35	- -	0,44
3	-		0,36	-	-	-	-	0,58
3	11		0,14	-	-	0,35		
3	12		0,35	-	-	0,45		
3	13		0,17	-	-	-	-	0,42
3	14		0,34	-	-	0,4		
3	15		0,17	-	-	0,35		
3	16		0,34	-	-	0,44		
3	17		-	0,25				
3	18		-	-	-	0,3		
3	19	3	-	-	-	0,32		
4	20		0,33	-	-	-	0,44	
4	21	4	0,16	-	-	-	0,33	
5	22	5	0,34	-	-	-	0,45	
6	23		0,35	-	0,43			
6	24		0,18					
6	-		0,35	-	-	-	-	0,5
6	-		0,43	-	0,48			

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B-1/6	25		0,1					
6	26		0,16					
6	27		0,25					
6	28		0,34					
6	29		0,25					
6	30		0,34					
6	31		-	0,26				
6	32		-	-	0,09	-	0,25	
6	33		-	-	0,27	-	0,35	
6	34	6	-	-	0,15			
7	35		0,34	-	-	0,44		
7	36		0,34	-	-	-	0,38	
7	37		0,08	-	-	0,26		
7	38		0,26	-	-	0,34		
7	39	7	-	-	0,26			
9	40		0,17	-	-	-	0,34	
9	41		0,17	-	0,34			
9	42		0,17	-	-	-	0,43	
9	43		0,17					
9	-		0,35	-	0,6			
9	44		0,26	0,34				
9	45		0,25	-	-	0,35		
9	46		0,17	-	-	-	0,35	
9	47		0,35	-	-	-	0,43	
9	48		0,35	-	0,44			
9	49		-	-	0,17			
9	50	8	-	-	0,25			
9	51		-	-	-	0,16		
9	52		-	-	-	0,17		
10	-		0,35	-	-	-	0,52	
10	53		0,17	-	0,35			

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3. Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B-1/10	-		0,34	-	-	-	0,54	
10	54	9	-	-	0,17			
12	-		0,34	0,5				
12	55		0,26	-	-	0,34		
12	56		0,17	-	-	0,35		
12	57		0,17	-	-	0,34		
12	58	10	-	0,17	-	-	0,35	
13	59		0,34	-	-	0,42		
13	60		0,35	-	-	0,43		
13	61		0,25					
13	62		0,35	-	-	0,43		
13	63		0,16	-	-	0,35		
13	64		0,17					
13	65		0,35					
13	66		0,26	-	-	-	0,43	
13	67		-	0,17				
13	68		-	0,09				
13	69	11	-	-	0,17			
14	70		0,34	-	-	0,44		
14	71		0,26					
14	72		0,17	-	-	0,34		
14	73		0,34					
14	74	12	0,17					
14	75		0,09	-	-	-	0,43	
14	76		0,17					
14	77		0,17					
14	78		0,09					
15	-		0,35	-	-	0,59		
15	79		0,34	0,43	-	-	0,44	
15	80		0,1	-	0,26	-	0,43	
15	81		0,25	-	-	-	0,34	

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B-1/15	82		0,34	-	-	-	0,43	
15	83	13	-	-	0,17	-	0,34	
15	84		-	-	0,15	-	0,43	
16	-		0,34	-	-	0,5		
16	-		0,35	0,43	-	-	0,48	
16	-		0,35	0,41	-	-	-	0,6
16	85		0,17	-	0,34			
16	86		-	0,26	-	0,43		
16	87		-	-	0,25			
16	88		-	-	0,17	-	0,34	
17	-		0,34	-	0,43	-	-	0,6
18	-		0,34	-	-	0,43	-	0,49
18	89		0,35					
18	90		-	0,26	-	0,34	0,43	
18	91		-	-	0,1	-	0,34	
19	92		0,26	-	-	-	0,35	
20	-		0,34	0,43	-	-	-	0,49
20	93		0,17					
20	94		0,26	-	-	-	0,34	
20	95		0,34	-	-	-	0,43	
20	96	15	0,17					
20	97		0,25	-	-	-	0,35	
20	98		0,15	-	-	-	0,35	
20	99		0,26	-	-	0,43		
20	100		0,34	-	0,43			
20	101		0,25	-	-	-	0,34	
20	102		0,17	-	-	-	-	0,34
20	103		0,17	-	-	-	0,34	
20	104		0,34	-	-	-	0,43	
20	105		-	-	0,17			
20	106		-	-	0,09	-	-	0,26

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B-1/20	107		-	-	0,17			
20	108		-	-	0,15			
20	109		-	-	0,09	-	-	0,25
20	110	14	-	-	0,17			
20	111	16	-	-	0,17	-	-	0,35
20	112		-	-	0,17	-	-	0,34
20	113		-	-	-	0,17		
21	114		0,17					
21	115		0,34	0,43				
21	116		0,25					
21	117		0,34	-	0,43			
21	118		0,26					
21	119		-	0,17	-	-	0,34	
21	120		-	0,1	-	-	0,26	
21	121		-	0,09	-	0,17		
21	122		-	0,1	-	-	0,34	
21	123		-	0,1	-	-	0,35	
21	124		-	0,09				
21	125	17	-	0,17				
21	126		-	-	-	-	0,17	
21	127	30	-	-	-	-	0,17	
22	-		0,34	0,43	-	0,6		
22	128		0,17	-	-	0,34		
22	129		0,26	0,34				
22	130	18	0,17					
22	-		0,35	0,42	-	-	0,65	
22	131		0,17	0,34				
22	132		0,09	-	-	0,34		
22	133		0,17	-	0,34			
23	-		0,34	0,43	0,5			
24	134	19	0,25	-	-	0,35		

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
B-1/24	-		-	0,34	-	0,43	0,55	
25	135		0,26	0,35	-	-	0,43	
25	-		0,34	0,43	-	-	0,45	
25	-		0,34	-	0,43	-	0,48	
25	136		-	-	0,17	-	0,34	
26	137		0,34	-	-	0,43		
26	138	20	-	-	-	0,25		
27	-		0,34	-	-	0,43	0,5	
27	139		0,09	-	0,25	-	0,43	
27	140		0,34	-	-	-	0,43	
27	141	21	0,17	-	-	0,34		
27	142		-	-	0,17			
28	-		0,43	-	0,6			
28	143	22	-	-	0,17			
28	144		-	-	0,25	-	0,34	
29	145		0,34	-	0,43			
29	146		0,26	-	0,35			
29	147		-	0,17	0,25			
29	148	23	-	-	-	0,25		
V-1/1	-		0,25	0,43	-	0,5		
2	149		0,34	-	-	-	0,43	
2	150	24	0,17	-	-	-	0,35	
3	151		0,26	-	-	0,34		
3	152		0,17					
3	153		0,34	-	-	-	0,43	
3	154		0,35	-	-	-	0,4	
3	155		0,17	-	-	-	0,34	
3	156		0,34	-	-	0,43		
3	157	25	0,34					
3	158		0,17	-	-	-	0,34	
3	159		0,17	-	-	-	0,35	

(Fortsetzung Tabelle 4)

Platte Nr.	Zk. Nr.	Subkultur Nr.	Sichtbarwerden, weiteres Wachstum, bzw. Eliminierung der Zwergkol.; nach Tg. Bebrütung					
			1 Tag	2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	5 Tg.	6 Tg.
V-1/3	160		0,17	-	-	-	0,43	
3	161		-	0,17	- -	-	0,43	
3	162			0,34	-	0,43		
3	163		-	-	0,09	-	0,25	
3	164		-	-	0,17			
3	165		-	-	-	0,25		
4	-		0,34	0,43	-	-	0,6	
4	166		0,17	-	0,34			
4	167		0,17	-	-	0,25		
4	168	26	0,17	-	-	0,34		
T-1/1	169	27	0,25	-	0,35			
1	170		-	0,26	0,34	-	0,43	
2	171		0,26	-	0,35			
2	172		0,34	-	0,43			
2	173		0,26	-	0,34			
3	-		0,34	0,43	-	-	-	0,62
3	174		0,17	-	0,34			
3	175		0,17	-	-	0,43		
3	176		0,34	-	-	0,42		
3	-		0,35	-	-	-	0,45	
3	177	28	-	-	0,17			
3	178	29	-	-	-	-	0,25	
4	-		0,34	0,4	0,43	-	0,49	
5	-		0,34	-	-	-	0,47	
5	-		-	0,34	-	0,43	0,51-	

TABELLE 5

Anzahl bestrahlter Kolonien pro Platte

Platte Nr.		Gesamtzahl der Kolonien	Normal große Kolonien	Zwergkolonien	
B-1	1	640	635	5	
	2	724	720	3	(1)
	3	991	978	11	(2)
	4	695	693	2	
	5	671	670	1	
	6	868	854	12	(2)
	7	760	755	5	
	8	396	396	-	
	9	984	970	13	(1)
	10	785	781	2	(2)
	11	467	467	-	
	12	695	690	4	(1)
	13	988	977	11	
	14	1092	1083	9	
	15	729	722	6	(1)
	16	580	573	4	(3)
	17	800	799	-	(1)
	18	768	764	3	(1)
	19	617	616	1	
	20	865	843	21	(1)
	21	803	789	14	
	22	706	698	6	(2)
	23	693	692	-	(1)
	24	659	657	1	(1)
	25	613	609	2	(2)
	26	547	545	2	
	27	679	674	4	(1)
	28	430	427	2	(1)
	29	707	703	4	

(Fortsetzung Tabelle 5)

Platte Nr.		Gesamtzahl der Kolonien	Normal große Kolonien	Zwergkolonien
V-1	1	617	616	- (1)
	2	731	729	2
	3	650	635	15
	4	433	429	3 (1)
T-1	1	494	492	2
	2	1065	1062	3
	3	513	506	5 (2)
	4	689	688	- (1)
	5	443	441	- (2)

Im ganzen entstanden unter 26 575 Kolonien 178 echte Zwergkolonien, das sind 0,67% (oder ein Verhältnis von 149 : 1). Nicht eingerechnet wurden 31 anfänglich als Zwergkolonien angesehene Kolonien, deren endgültige Größe jedoch zwischen der der Zwergkolonien und der normalen Kolonien lag (also zwischen 0,5 und 0,7 mm große Kolonien).

Nach 1 Tag Bebrütung wurden 119 echte Zwergkolonien erkannt,
" 2 Tagen " kamen 19 " " hinzu,
" 3 Tagen " " 29 " " " ,
" 4 Tagen " " 8 " " " ,
" 5 Tagen " " 3 " " " .

Das mittlere Größenverhältnis zwischen Zwerg- und Normal-Kolonien lag zwischen 1 : 20 und 1 : 70.

Der Abstand der Zwergkolonien von den benachbarten (normalen) Kolonien war verschieden groß. Er betrug im Durchschnitt 0,25 mm (Schwankungsbreite 0,09 bis 1,0 mm).

5. Isolierung und Subkultur von Zk. und unbestrahlten Vergleichskolonien

Die in Tabelle 4, Spalte 3 registrierten 30 Zwergkolonien wurden mittels einer spitzendigenden Öse unter dem Plattenmikroskop (bei 12facher Vergrößerung), ohne daß dabei normal große Kolonien berührt wurden (Mindestabstand zu Nachbarkolonien: 0,25 mm), isoliert und in je 3 ccm Phosphatpuffer überimpft. Außerdem wurde zum Vergleich von verschieden großen Kolonien unbestrahlter Keime Bakterienmaterial entnommen (Numerierung von 31 bis 53) und ebenfalls in 3 ccm Phosphatpuffer suspendiert.

Die isolierten Keime im Phosphatpuffer wurden 30 min. im Schüttler gleichmäßig verteilt und dann je 0,1 ccm auf je 1 Platte Tryptoseagar (Bezeichnung: T-1 bis T-53), Mc. Conkeyagar (K-1 bis K-53), Minimalagar (M-1 bis M-53) bzw. in 1 Reagenzglas mit Nährbouillon und Minimalmedium überimpft.

6. Koloniemorphologie der Subkulturen

Die Kolonien auf Tryptose- und Mc. Conkey-Agar hatten nach 24 Stunden Bebrütung 3/4 ihrer endgültigen Größe erreicht und waren nach 2 Tagen ausgewachsen. Ihre Größe schwankte zwischen 1 und 6,5 mm. Das Wachstum sowohl der Zk.-Subkulturen als auch der Kontrollen war gegenüber der Ausplattung der Elternkolonien sehr ungleichmäßig, es waren pro Platte eine beträchtliche Anzahl kleiner Kolonien (0,5 - 0,9 mm groß) zu finden.

Auf Tryptoseagar waren die größeren Kolonien nach 3 - 4 Tagen Bebrütung von einem 0,1 - 0,15 mm breiten, hellen, rosettenartig die Kolonien umgebenden Rand begrenzt.

Auf Mc. Conkey-Agar trat der helle Rand nicht auf, dafür waren aber die Kolonieränder mehr oder weniger stark gezackt.

Auf Minimalagar war nach 24 Stunden Bebrütung weder bei Kontrollen, noch bei Zwergkolonie-Subkulturen ein Wachstum festzustellen. Nach 2 Tagen waren winzige, hauchdünne Kolonien zu sehen, die nach 4 Tagen schließlich zu ihrer endgültigen Größe von ca. 0,5 mm (0,3 - 1,0 mm)

herangewachsen waren. Die Kolonien hatten einen dunklen, dichten Kern, der Kolonierand war bei den meisten Kolonien gezackt. Auf vielen Platten wuchsen neben den kleinen Kolonien auch einige wenige große Kolonien (wie sie auf Tryptose- und M. Conkey-Agar wuchsen). Diese Kolonien waren meist etwas gefältelt oder wie seitlich zusammengeschoben.

Bis auf die Subkulturen der Zwergkolonien Nr. 8 und 13 waren auch mit der Henry'schen Beleuchtungstechnik keine koloniemorphologischen Unterschiede zu finden.

Die Zk.-Keime Nr. 8 wuchsen auf Tryptoseagar in 6 verschiedenen Formen:

a) Als verhältnismäßig große (3 - 5 mm) amöboide Kolonien mit gezacktem Rand, die vom Zentrum aus kontinuierlich nach peripher zu heller wurden.

b) Der weitaus größte Teil der Kolonien war rund und hatte ein ziemlich dunkles Zentrum, das verhältnismäßig hoch über die Agaroberfläche hinausragte. Auf den glatten Rand zu wurden diese Kolonien kontinuierlich heller. Ihre Größe betrug zwischen 1 und 2 mm.

c) Als eine Zwischenform zwischen a) und b) konnte eine Anzahl runder Kolonien mit dunklem Zentrum, gezacktem Rand und einer Größe zwischen 1,5 und 3 mm angesehen werden.

d) 3 einzelne Kolonien fielen besonders auf: 2 davon waren wie aus einzelnen Ringen zusammengesetzt, und zwar vom Zentrum aus abwechselnd dunkel-hell-dunkel-hell. Beide Kolonien schimmerten bei 'Henry-scher' Beleuchtung rötlichgelb; die eine hatte einen glatten, die andere einen gezackten Rand. Die dritte Kolonie war rosarot gefärbt.

Auf Mc. Conkey-Agar wuchsen ebenfalls die Formen a), b) und c), die Formen d) dagegen nicht.

Auf Minimalagar waren keine Unterschiede gegenüber anderen Platten festzustellen.

Die Subkulturen der Zwergkolonien Nr. 13 wuchsen auf allen Nährmedien als dunkle, ca. 1 mm große Kolonien mit stark gewölbter Oberfläche und hellem Rand. Der direkte Übergang von dem dunklen Zentrum in den hel-

len Rand war charakteristisch für alle diese Kolonien. Eigenartigerweise erschien bei Henry'scher Beleuchtungstechnik das Zentrum heller als der periphere Kolonieanteil.

7. Zellmorphologie der Subkulturen

Es wurden alle Zwergkolonie-Subkulturen und 10 Vergleichskulturproben lebend (im Phasenkontrast) und abgetötet nach Karbolfuchsinfärbung im Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung untersucht. Unterschiede konnten nicht festgestellt werden; es war weder die Beweglichkeit der Zk.-Subkulturen vermindert, noch war ihre Stäbchenform oder ihre Färbbarkeit durch Karbolfuchsin irgendwie verändert. Auch die verschiedenen Formen der Zk.-Subkulturen Nr. 8 und 13 waren zellmorphologisch nicht von den Bakterienzellen anderer Platten oder der Vergleichskeime zu unterscheiden.

Zur Herstellung der Mikrokolonien nach SCHNEWEIS (145) wurden Zwergkolonie-Subkulturen Nr. 8a), b), cb), d); 13; 15; 18; 26 und Vergleichskeime Nr. 31 - 35 verwendet. Die wachsenden Mikrokulturen waren bei allen Proben gleich, es waren weder Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit, noch das Auftreten von Bakterienzellketten, wie sie SCHNEWEIS beschrieben hatte, zu erkennen.

8. Wachstum der Subkulturen in flüssigem Medium

Die Beobachtung des Wachstums aller Subkulturen in Nährbouillon und Minimalmedium erstreckte sich über eine Bebrütungszeit von 9 Tagen bei 37° C. Als Kriterium wurden verwendet: für die Stoffwechselaktivität die Schwefelwasserstoffbildung (Schwarzfärbung der in die Röhrchen eingehängten Bleiazetatstreifen), für das Wachstum und die Beweglichkeit die Trübung, und für den Verlust der Beweglichkeit die Bildung eines Niederschlages unter einer klaren überstehenden Flüssigkeit.

Wiederum waren keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den Nachkommen normaler, unbestrahlter Keime und den Zk.-Abkömmlingen festzustellen. Auffallend war nur, daß Nr. 2 und 20 in Minimalmedium nicht wuchsen, obwohl mit der gleichen Phosphatpuffer-Bakterien-Auf-

schwemmung in gleicher Weise wie bei Beimpfung der festen Nährböden und der Nährbouillon verfahren wurde. Die Zk.-Keime Nr. 1, 13, 15, 18 und 26 wuchsen in Minimalmedium sehr schlecht, alle anderen Proben zeigten dagegen ein normales Wachstum.

9. Biochemische Untersuchung der Subkulturen

a) Die 'Bunte Reihe':
Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität der Zwergkolonie-Subkulturen gegenüber den Vergleichsproben wurde Kolonienmaterial vom 24 Stunden bebrüteten Tryptoseagar in je 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und davon je ein Tropfen in je ein Indikatorröhrchen mit dem jeweiligen Kohlehydrat überimpft.

Nach 24ständiger Bebrütung zeigte der Umschlag des Indikators von blau nach gelborange bei allen Proben an, daß das Fermentationsvermögen der Zk.-Subkulturen für die getesteten Kohlehydrate nicht gestört war. Auch die Gasbildung im Dextrose- und im Mannitröhrchen war, sichtbar an den gasgefüllten Durham-Röhrchen, bei den Zk.-Abkömmlingen ebenso stark vorhanden wie bei den Kontrollen.

b) Die Ammon-Reihe:
Zur Beimpfung des Ammon-Substrates nach HOHN u. HERMANN (60) wurde eine mit 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmte 20-stündige Schrägagarkultur aller Subkulturproben hergestellt. Dann wurde auf jedem Agarröhrchen je eine 'volle' Öse dieser Aufschwemmung ausgestrichen. Die beimpften Röhrchen wurden bei 37° C bebrütet, die Ablesung erstreckte sich über 4 Tage.

Tabelle 6 zeigt die tägliche Registratur des Wachstums der Bakterien-(Kolonien) und der Verfärbung des Indikators als Reaktion auf die Fermentation des betreffenden zugesetzten Kohlenhydrates.

TABELLE 6

Wachstum der Subkulturen auf Ammon-Agar

Zk. Nr.	Dextrose 1	2	3	Arabinose 1	2	3	Dulzit 1	2	3	Na-Zitrat 1	2	3
1	W+			W(+)	1/2+	+	W-	3/4+	+	W+		
2	1/2+	W+		W1/4+	3/4+	+	W-	3/4+	+	W+		
3	1/2+	W+		W(+)	3/4+	+	W(+)	3/4+	+	W+		
4	1/2+	W+		W1/4+	3/4+	+	W1/4+	3/4+	+	W+		
5	3/4+	W+		W(+)	1/4+	+	W-	1/2+	+	W+		
6	1/2+	+	W	W(+)	1/2+	+	W(+)	3/4+	+	W+		
7	W1/2+	+		W(+)	1/2+	+	W-	3/4+	+	W+		
8	1/2+	W+		W(+)	3/4+	+	-	W3/4+	+	W+		
9	W3/4+	+		W(+)	3/4+	+	W-	3/4+	+	W+		
10	1/2+	W+		1/4+	W+		W(+)	3/4+	+	W+		
11	W1/4+	+		W(+)	1/4+	3/4+	W(+)	W(+)	1/4+	W+		
12	W1/4+	+		W(+)	1/4+	1/2+	W-	1/4+	1/2+	W+		
13	W+			W(+)	+		W-	+		W1/4+	+	
14	W1/2+	+		W(+)	1/4+	1/2+	W(+)	1/4+	1/2+	W+		
15	W1/4+	+		W-	(+)	3/4+	W-	+		W+		
16	W1/4+	+		W(+)		1/2+	W(+)	1/2+	3/4+	W+		
17	W1/4+	+		W-	3/4+	+	W(+)	1/2+	1/2+	W+		
18	W1/4+	+		W-	1/2+	3/4+	W(+)	1/4+	3/4+	W+		
19	W3/4+	+		W(+)	1/2+	3/4+	W(+)	1/2+	+	W3/4+	+	
20	W1/2+	+		W(+)	1/4+	3/4+	W(+)	1/2+	3/4+	W+		

21	W1/2+	+		W1/4+		+	W(+)	1/2+	3/4+	W+			
22	W1/2+	+		W(+)	1/2+	+	W(+)	1/2+	3/4+	W+			
23	W3/4+	+		W(+)	1/4+	+	W-	1/4+	1/2+	W+			
24	W1/2+	+		W(+)	1/4+	+	W-	1/4+	+	W+			
25	W1/4+	+		W-	(+)	1/2+	W-	(+)	1/4+	W+			
26	W1/4+	+		W(+)	1/4+	+	W(+)	1/4+	1/2+	W+			
27	W+			W1/2+	+		W-	1/4+	1/2+	W+			
28	W1/2+	+		W(+)	1/4+	+	W(+)	1/4+	3/4+	W+			
29	W+			W(+)	1/2+	+	W-	1/4+	1/2+	W3/4+	+		
30	W+			W(+)	1/4+	+	W(+)	1/4+	3/4+	W+			
31	1/4+	+		W(+)	3/4+	+	W(+)	3/4+	+	W+			
32	+		W	(+)	W3/4+	+	-	W1/2+	+	W+			
33	1/2+	W+		W(+)	3/4+	+	W(+)	3/4+	+	W+			
34	1/2+	W+		(+)	W3/4+	+	(+)	W3/4+	+	W+			
35	W1/2+	+		W(+)	3/4+	+	W(+)	3/4+	+	W+			
36	1/2+	W+		W(+)	3/4+	+	-	W3/4+	+	W+			
37	W1/2+	+		W(+)	1/4+	+	W-	3/4+	+	W+			
38	W1/2+	+		W(+)	1/2+	+	W(+)	+		W+			
39	W1/2+	+		(+)	W3/4+	+	W(+)	3/4+	+	W+			
40	W1/2+	+		W(+)	3/4+	+	W-	3/4+	+	W+			
41	W3/4+	+		W1/4+		3/4+	W(+)	1/4+	3/4+	W+			
42	W1/2+	+		W(+)	1/4+	1/2+	W(+)	1/2+	3/4+	W+			
43	W1/2+	+		W(+)		3/4+	W-	(+)	1/4+	W+			
44	W1/2+	+		W(+)	1/4+	1/2+	W(+)	1/4+	1/2+	W+			
45	W1/2+	+		W(+)	1/2+	3/4+	W(+)	1/2+	3/4+	W+			
46	W+			W(+)	1/4+	3/4+	W(+)	1/4+	3/4+	W+			

(Fortsetzung Tabelle 6)

Zk. Nr.	Dextrose 1	2	3	Arabinose 1	2	3	Dulzit 1	2	3	Na-Zitrat 1	2	3
47	W3/4+	+		W-	3/4+		W-	1/4+	1/2+	W+		
48	W1/2+	+		W(+)	1/2+	3/4+	W(+)	1/4+	3/4+	W+		
49	W+			-	W(+)	1/2+	W(+)	1/4+	1/2+	W+		
50	W1/2+	+		W(+)	3/4+		W(+)	1/2+	+	W+		
51	W3/4+	+		W1/4+	3/4+	+	W(+)	1/4+	1/2+	W+		
52	W1/2+	+		W1/4+		+	W(+)	1/4+	1/2+	W+		
53	W3/4+	+		W1/4+	1/2+	+	W-	1/4+		W+		
54	W1/2+	+		W1/4+	3/4+	+	W-	(+)	1/2+	W+		
55	W+			W1/4+	3/4+	+	W(+)	1/4+	1/2+	W3/4+	+	
56	W+			W1/2+		+	W(+)	1/2+	+	W+		
57	W3/4+	+		W1/4+	3/4+	+	W(+)		3/4+	W+		
58	W3/4+	+		W(+)	1/4+	+	W(+)	1/4+	1/2+	W3/4+	+	

Zeichenerklärung:

+ = Gelbfärbung (bzw. bei Na-Zitrat Blaufärbung)
1/2+ = Agar halbverfärbt
(+) = Agar wenig verfärbt (hell- bis gelbgrün)
- = keine Verfärbung
W = Bakterienwachstum (-rasen) sichtbar

c) Wachstum auf Tetrazoliumagar

Nach SCHÖNBERG (117) können verschiedene Bakterien an ihrer typischen Bildung von tiefrotem Formazan aus farblosem Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) erkannt werden. Salmonellen bilden auf TTC-Agar im allgemeinen runde Kolonien von tiefroter Farbe mit einem hellen Hof. Rauhformen bilden kein Formazan, sind also farblos; Intermediärformen können nur bedingt Formazan bilden.

In den Versuchen wurden je 10 Zk.-Subkulturen und je 5 Kontrollen auf je eine TTC-Platte in den Verdünnungen 1 : 2500, 1 : 5000 und 1 : 10 000 ausgespatelt.

Ein Unterschied zwischen der Formazanbildung bei Zk.-Subkulturen und bei Kontrollen konnte nicht gefunden werden. Alle auf den Platten gewachsenen Kolonien unter 1,5 mm Durchmesser waren nicht gefärbt (weiß), größere Kolonien von 1,2 - 2 mm Durchmesser waren im Zentrum rot gefärbt, und große Kolonien waren gänzlich tiefrot gefärbt bis auf einen 0,2 - 0,3 mm breiten, hellen Hof um die Kolonien.

d) Kristallviolettfärbung

Die Zk.-Subkulturen auf festem Medium (Tryptose-, Mc, Conkey-, Minimal-Agar) und die Kontrollen wurden nach 4tägiger Bebrütung mit der Kristallviolettlösung nach ULBRICH (134) getränkt. Es konnten auch bei Beobachtung mit der HENRYschen Beleuchtungstechnik keine abnormen Farbtöne bei den gefärbten Kolonien festgestellt werden; auch die auf den Platten Nr. 8 und 13 wachsenden koloniemorphologisch unterschiedlichen Kolonien färbten sich mit Kristallviolett gleichmäßig blau.

10. Serologische Untersuchung der Subkulturen

a) Die Kochprobe

Die Kochprobe, d. i. das einstündige Erhitzen von Bakterienaufschwemmungen bei 100° C, wird zur Erkennung von Rauhformen verwendet. Während nämlich S-Formen nach dem Kochen die gleichmäßige Trübung der Aufschwemmung beibehalten, flocken R-Formen mehr oder weniger stark aus.

Von den Zk.-Subkulturen auf Tryptoseagar und den zugehörigen Kontrollen wurde so viel Bakterienmaterial in bis zur Hälfte mit physiologischer

NaCl-Lösung gefüllte Agglutinationsröhrchen gebracht, bis die Aufschwemmung mittelmäßig getrübt war. Daraufhin wurden die Röhrchen eine Stunde lang im Dampftopf bei 100°C sterilisiert. Es konnte jedoch danach in keinem Röhrchen eine Ausflockung beobachtet werden, auch nicht nach 24stündigem Stehenlassen der Proben.

b) Agglutination durch unspezifische Salz- und Farbstofflösungen

Rauhformen und teilweise auch Intermediärformen agglutinieren mehr oder weniger gut in 0,85- und 3,5%iger NaCl-Lösung oder in 0,1- und 0,2%iger Trypaflavin-Lösung.

Es wurden alle Zk.-Subkulturen und Kontrollen untersucht. Von agglutinierenden Keimen wurden mehrere Proben gemacht.

Tabelle 7 zeigt, daß Nr. 15 und 26 in 0,1- und 0,2%iger Trypaflavin-Lösung spontan agglutinierten. Nach einiger Zeit (ca. 5 min.) agglutinierten auch Nr. 6 und 10. Die übrigen, sehr langsam agglutinierenden Keime, z. B. Nr. 20 und 21, konnten im Phasenkontrastmikroskop nicht mit Sicherheit als eine Verballung von Bakterien angesehen werden, es konnte sich auch um Verklumpungen kleiner Trypaflavinteilchen gehandelt haben. In den NaCl-Lösungen trat keine Agglutination ein.

c) Agglutination mit Salmonella-Faktoren-Seren

In den Faktorenseren 0-4, 0-5 und H-i agglutinierten alle Subkulturen spontan, im H-2-Serum agglutinierten die Keime nicht. Das 0-4-Serum agglutinierte auch Keime, die schon 14 Tage alt waren (= vor 14 Tagen ausgeplattet), das 0-5 und das H-i-Serum dagegen nicht. Unterschiede zwischen Zk.-Subkulturen und Kontrollen konnten nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

TABELLE 7

Serologische Untersuchung der Subkulturen

(Zk.)-Subkultur-Platte Nr.	NaCl-Lsg. 0,85 und 3,5%	Trypaflavin-Lsg. 0,1%	Trypaflavin-Lsg. 0,2%	Salmonella-Faktoren-Seren 0-4	0-5	H-i	H-2
1	-	-	(+)	+	+	+	-
2	-	-	-	+	+	+	-
3	-	-	-	+	+	+	-
4	-	-	-	+	+	+	-
5	-	-	-	+	+	+	-
6	-	(+)	(+)	+	+	+	-
7	-	-	-	+	+	+	-
8	-	-	-	+	+	+	-
9	-	-	(+)	+	+	+	-
10	-	(+)	(+)	+	+	+	-
11	-	-	-	+	+	+	-
12	-	-	-	+	+	+	-
13	-	-	-	+	+	+	-
14	-	-	-	+	+	+	-
15	-	+	+	+	+	+	-
16	-	?	?	+	+	+	-
17	-	-	?	+	+	+	-
18	-	-	-	+	+	+	-
19	-	-	-	+	+	+	-
20	-	-	?	+	+	+	-
21	-	?	?	+	+	+	-
22	-	-	-	+	+	+	-
23	-	-	-	+	+	+	-
24	-	-	-	+	+	+	-
25	-	-	-	+	+	+	-
26	-	+	+	+	+	+	-
27	-	-	-	+	+	+	-
28	-	-	?	+	+	+	-
29	-	-	-	+	+	+	-
30	-	-	-	+	+	+	-
31	-	-	-	+	+	+	-

(Fortsetzung Tabelle 7)

Zk.)-Subkultur-Platte Nr.	NaCl-Lsg. 0,85 und 3,5%	Trypaflavin-Lsg. 0,1%	Trypaflavin-Lsg. 0,2%	Salmonella-Faktoren-Seren 0-4	0-5	H-i	H-2
32	-	-	-	+	+	+	-
33	-	-	-	+	+	+	-
34	-	-	-	+	+	+	-
35	-	-	-	+	+	+	-
36	-	-	-	+	+	+	-
37	-	-	-	+	+	+	-
38	-	-	-	+	+	+	-
39	-	-	-	+	+	+	-
40	-	-	-	+	+	+	-
41	-	-	-	+	+	+	-
42	-	-	-	+	+	+	-
43	-	-	-	+	+	+	-
44	-	-	-	+	+	+	-
45	-	-	-	+	+	+	-
46	-	-	?	+	+	+	-
47	-	-	-	+	+	+	-
48	-	-	-	+	+	+	-
49	-	-	-	+	+	+	-
50	-	-	-	+	+	+	-
51	-	?	?	+	+	+	-
52	-	-	-	+	+	+	-
53	-	-	-	+	+	+	-
54	-	-	-	+	+	+	-
55	-	-	?	+	+	+	-
56	-	?	?	+	+	+	-
57	-	-	-	+	+	+	-
58	-	?	?	+	+	+	-

Zeichenerklärung:

- \- = keine Agglutination
- ? = fragliche Agglutination nach 5 min.
- (+) = Agglutination nach ca. 5 min.
- \+ = spontane Agglutination (nach ca. 20 sec.)

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wenn ich in meinen Ausführungen und bei Beschreibung der Literatur von Zwergkolonien (Zk.) oder SCV (Small-Colony-Variante) gesprochen habe, so meine ich damit sowohl die in der bakteriellen Dissoziation bekannten D- als auch die G-Formen, deren Unterscheidung bei Besprechung von Zk.-Formen in der Literatur nur von BRAUN (19; 21) beschrieben wurde, bei denen es sich aber wahrscheinlich doch um ein und dieselben Varianten handeln könnte.

Es wurde die Bakterienart Salmonella typhimurium (Breslau S) verwendet, um u. U. eine durch die Bestrahlung veränderte Antigenstruktur und Virulenz der Zk. für immunbiologische Forschungen heranziehen zu können. In den Untersuchungen wurden 50 kV-Röntgenstrahlen benutzt, die sich durch ihre Weichheit gut zur Bestrahlung von Bakterien eignen. Die Bestrahlungsdosis von 75 000 Röntgen erbrachte eine Überlebendenrate von 10^{-5} Keimen, wenn wachsende Bakterien in Anwesenheit von Sauerstoff bestrahlt wurden.

Nach Ausplattung der bestrahlten Keime wuchsen nur 0,67 % der Überlebenden als Zk. Viele Autoren erhielten wesentlich mehr Zk., so z. B. CLOWES u. ROWLEY (25) 10 - 50 %, WEED u. LONGFELLOW (137) 150 Zk. pro Platte. Allerdings ist zu bedenken, daß in den Versuchen der meisten Autoren das antibakterielle Agens dauernd auf die koloniebildenden Keime einwirkte, während die Bestrahlung vor der Kolonienbildung stattfand und diese deshalb nur ein einziges Bakterium der späteren Kolonie beeinflussen konnte.

In den Untersuchungen von RYAN u. SCHNEIDER (113) und DAVIS (31), die als einzige Quellen für strahleninduzierte Zk. genannt werden können, wurden die Zk. durch Ausplatten bestrahlter Colikeime auf Minimalmedium erhalten. Auf Nähragar oder nach Zugabe von Histidin zum Minimalagar wuchsen die bestrahlten Keime im Gegensatz zu meinen Untersuchungen vollkommen normal.

Auch die Bakterienart bzw. deren mutagene Labilität spielt eine große Rolle. So arbeiteten die meisten Autoren mit E. coli. Schwieriger war die Induktion von Zk. bei Salmonellen in den Arbeiten von STOKES u.

BAYNE (127), die erst nach 1- bis 2wöchiger Einwirkung von Lithiumsulfat Zk. erhielten.

Die Größe der in der Literatur beschriebenen Zk. schwankt in sehr weiten Grenzen. Die meisten Autoren beschreiben Zk. mit einer Größe zwischen 0,5 und 1 mm (26), (137), (25), (127), WEINBERGs (138) Zk. waren dagegen unter 0,15 mm groß. Die von DUFF (37) erhaltenen, 0,1 - 0,3 mm großen Zk. entsprechen größenmäßig den in meinen Versuchen gefundenen Zk. Ein verzögertes Erscheinen der Zk. bis 5 Tage nach Beimpfung der Platten mit bestrahlten Keimen ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden; bekannt ist jedoch das verzögerte Wachstum strahleninduzierter Mutanten. So wies DEMEREC (32) nach, daß T1-Phagenresistente Mutanten von E. coli sich erst nach 12 Generationen unbestrahlter Keime zu teilen begannen. RYAN (12) konnte bei bestrahlten Keimen ein verzögertes Wachstum von 12 - 24 Stunden nachweisen.

Die meisten Zk. wuchsen nach dem Tag ihrer Entstehung geringfügig weiter (vergleiche Tabelle 4), die meisten hatten nach 2 Tagen ihres Sichtbarwerdens ihre endgültige Größe erreicht. Daß der langsam austrocknende Agarnährboden nicht an dem Stillstand des Zk.-Wachstums schuld ist, beweisen a) das Entstehen von Zk. am 4. und 5. Tag nach Beimpfung und b) das normale Wachstum von Bakterien auf einige Tage lang unbeimpft bebrüteten Agarplatten.

Die später eliminierten Kolonien, die anfänglich als Zk. gedeutet wurden, wuchsen sehr schnell weiter und hatten nach 5 - 6 Tagen Bebrütung eine Größe um 0,6 mm erreicht, so daß schließlich eine "verbindende" Zwischengröße zwischen Zk. (bis 0,45 mm groß) und normalen Kolonien (ab 0,6 mm) fehlte. Wie Tabelle 5 zeigt, muß nicht unbedingt eine Platte mit einer erhöhten Anzahl von normalgroßen Kolonien auch mehr Zk. aufweisen. So entstanden auf Platte Nr. 14 1092 Kolonien; davon wuchsen nur 9 als Zk., während auf Platte Nr. 20 unter 865 Kolonien 21 Zk. wuchsen. Es ist also nicht anzunehmen, daß durch den eingeengten Platz bei vermehrtem Koloniewachstum auf der Platte auch mehr Zk. entstehen. Dies beweist auch der oftmals größere Abstand zwischen Zk. und ihren Nachbarkolonien und der benachbarter normalgroßer Kolonien.

Die Zk.-Subkulturen wuchsen ebenso wie die zugehörigen Kontrollen sehr unterschiedlich in einer Größe zwischen 0,5 und 6,5 mm. Ähnliche Ergebnisse beschrieben CLOWES u. ROWLEY (25), deren Zk.-Subkulturen zu 99% als normalgroße Kolonien wuchsen. Bei den meisten Autoren (z. B. (26), (136) u. a.) wurden gemischte Zk.-Subkulturen erhalten mit einer mehr oder weniger großen Anzahl von Zk. Die Zk. von WEINBERG (138) und GILLESPIE (48) dagegen ließen sich (die von WEINBERG erhaltenen über ein Jahr lang) als völlig stabile Zk. weiterzüchten.

Bei der biochemischen Untersuchung der Zk.-Subkulturen konnten, wie auch bei (25), keine Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt werden. Die meisten Autoren beschreiben Fermentationsverluste oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren (bei (113) Histidin, bei (57) Uracil, bei (138) Vitamine, bei (127) Cystein), KAUFMANNs Zk. (68) von S. eastbourne und S. typhi wuchsen in normaler Größe, wenn dem Agar kleine Mengen Thiosulfat oder Sulfit hinzugefügt wurde.

Die Prüfung der antigenen Struktur der Zk.-Subkulturen wurde bei den meisten Autoren unterlassen. ((25) und (127) prüften nur auf die O-Antigene durch Agglutination mit Mischantiseren. Es wurden hier keine Unterschiede gefunden, wie auch meine detaillierten serologischen Untersuchungen außer einer unspezifischen Trypaflavinagglutination negativ ausfielen. Über die Entstehungsweise und das Wesen der Zk. bestehen, wie schon die Literaturübersicht zeigt, die verschiedensten Meinungen.

Die Annahme BRAUNs (19), daß Zk. unzusammenhängende Varianten sind, die in einer Bakterienpopulation konstant durch Spontanmutation entstehen und durch besondere selektive Bedingungen (z. B. antibakterielle Agens), konnte in meinen Versuchen nicht bestätigt werden. 1. entstanden bei den unbestrahlten Bakterien überhaupt keine Zk. und 2. können die nach Röntgenbestrahlung entstandenen Zk. nicht als echte Mutanten angesprochen werden, weil sie nach Subkultur wieder als große Kolonien wuchsen und sich in keiner Weise von den unbestrahlten Keimen unterschieden. Die Zk. können aber auch kaum als Mutanten betrachtet werden, die durch einen mutationsbedingten erniedrigten Stoffwechsel gerade nicht geschädigt werden können, denn auch bei groß gewachsenen bestrahlten Kolonien konnten keine Unterschiede gegenüber unbestrahlten festgestellt werden. Auch LINDEGRENs (85) Theorie, daß die Zk.-Varianten durch

eine "Transgenation" (d. h. eine Mutation an einem umschriebenen Bereich des genetischen Materials) spontan zustande kommen, konnte von VOUREKA (136) widerlegt werden, der Zk. unter Bedingungen erhielt, die eine Selektion von Spontanmutationen ausschlossen.

Wahrscheinlicher ist deshalb eine Schädigung der als Zk. wachsenden Bakterienstammzellen durch die Bestrahlung, bzw. den "mutagenen" Stoff. Hierbei wäre zu unterscheiden zwischen einer genetischen (= induzierte Mutation) und einer nichtgenetischen Entstehung (= Modifikation) der Zk.

WEINBERG (138) betrachtet seine Zk. als echte Mutanten, die durch eine Verlustmutation unfähig geworden sind, wichtige Wachstumsfaktoren zu bilden. Demgegenüber konnten in meinen Versuchen keine Mangelmutanten gefunden werden, die Zk. waren in der Subkultur nicht stabil.

Mc. KINNEY u. MELLON (92) glauben, daß die von ihnen mit Chloramphenicol als antibakteriellem Agens erhaltenen Zk. ihren erniedrigten Stoffwechsel durch Zerstörung wichtiger Enzyme erhielten. YOUMANS (143) schreibt wiederum die Entstehung der Zk. einer erniedrigten Stoffwechselaktivität als Antwort auf die hemmende Wirkung des antibakteriellen Agens zu (Adaption!). Zweifelsohne wird durch die Bestrahlung in dem später eine Zk. bildendem Bakterium ein Defekt gesetzt, ganz gleich, ob durch direkte oder indirekte Wirkung. Zum Unterschied gegenüber den durch chemische antibakterielle Stoffe entstandenen Zk. muß der Defekt nach Bestrahlung sich noch einige Zeit in der Nachkommenschaft des geschädigten Bakteriums auswirken.

KIMBALL (73) nimmt an, daß die Bestrahlung die Bildung neuer Enzymbildungszentren, die in einer Bakterienzelle fortwährend neu gebildet werden müssen, verhindert. Dadurch könnte eine geringere Stoffwechselaktivität für eine gewisse Zeit erklärt werden.

In ähnlicher Weise erklärt EPHRUSSI (41) das Erscheinen von Zk. mit dem Verlust von zytoplasmatischen Einheiten und Zerstörung ihrer Nachbildung. Dies könnte zweifellos auch durch Bestrahlung der Fall sein. CLOWES u. ROWLEY (25), die die Zk. als echte Mutanten ansehen, vermuten, daß die geringe Stoffwechselaktivität der Zk. nicht auf Mangel

an Wachstumsfaktoren zurückzuführen sei, sondern vielmehr auf das Fehlen einiger unspezifischer Faktoren. Dadurch könnte eine Variation in der Permeabilität der Bakterienzellwand auftreten und bei deren Abnahme ein geringerer Stoffwechsel die Folge sein. Diese Annahme ist zweifellos berechtigt, es bleibt nur die Frage, ob diese Veränderung unbedingt eine genetische sein muß. Vielleicht setzen gerade hier die zytoplasmatischen Faktoren an, so daß eine nichtgenetische verminderte Stoffwechselaktivität verbleibt.

Unbekannt ist ferner, inwieweit die geschädigte, die Kolonie bildende Bakterienstammzelle ihre Nachkommenschaft direkt beeinflußt, u. U. durch Absonderung wachstums- oder stoffwechselhemmender Stoffe. Dann wäre auch das normale Wachstum der Zk.-Subkulturen zu erklären.

Auch ist eine toxische Beeinflussung der verzögert wachsenden Zk. durch die Nachbarkolonien möglich nach Art einer Schädigung der Varianten durch die Mutterzellen, wie sie ZAMENHOF (145) beschreibt.

Schließlich ist aber auch die Möglichkeit zu erwägen, daß innerhalb der Zeit, in der sich die geschädigte Bakterienzelle regeneriert und nicht teilt (bzw. verzögert wächst), die zur Bildung einer großen Kolonie nötigen Nährstoffe von den Nachbarkolonien dem Nährboden entzogen werden, so daß die Kolonie sich nur in geringem Maße vergrößern kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach einem in Vorversuchen entwickelten Verfahren wurden 0,6 x 10^8 Keime pro ccm von Salmonella typhimurium (Breslau S) mit 75 000 r Oberflächendosis weicher Röntgenstrahlen bestrahlt. Dabei sank die Anzahl der überlebenden Keime auf ca. 6 x 10^3/ml.

2. Nach Ausplattung auf verschiedene Nährmedien erschienen unter sonst völlig normalen Kolonien und im Gegensatz zu unbestrahlten Vergleichskeimen ca. 0,6% Zwergkolonien mit einer Größe zwischen 0,15 und 0,45 mm Durchmesser. Das Größenverhältnis zwischen normalen Kolonien und Zk. schwankte zwischen 20 : 1 und 70 : 1. Die meisten Zk. wurden schon nach 24stündiger Bebrütung der bestrahlten Keime beobachtet, es erschienen aber auch verzögert weitere Zk. bis 5 Tage nach der Ausplattung.

3. 30 der kleinsten Zk. wurden isoliert und auf verschiedene feste und flüssige Medien überimpft. Die Zk.-Subkulturen wuchsen im Vergleich mit den Kontrollkulturen völlig normal. Das Wachstum im Minimalmedium war bei einigen Zk.-Subkulturen herabgesetzt. Es konnten keine biochemischen Mangelmutanten ermittelt werden. Während zellmorphologisch keine Unterschiede zu bemerken waren, waren die Zk.-Subkulturen Nr. 8 und 13 koloniemorphologisch verändert. Rauh-Formen konnten nicht gefunden werden. Serologische Unterschiede ergaben nur die Spontanagglutination der Zk.-Subkulturen Nr. 15 und 26 in 0,1 und 0,2%iger Trypaflavinlösung.

4. Die durch die Röntgenbestrahlung entstandenen Zk. können nicht als echte Mutanten betrachtet werden. Sie sind vielmehr als temporäre Modifikationen anzusehen, die durch eine gewisse Strahlenschädigung eine momentane Wachstumshemmung erfahren haben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ALEXANDER, P. u. CACCHI, R. — Soc. Internaz. Microbiol. Boll. Sez. Ital. 10, 298 (1938)

(2) ALEXANDER, P. u. CHARLESBY, A. — Radiobiol. Symp. (Lüttich) Butterworth, London (1955)

(3) ALPER, T. u. HOWARD-FLANDER, P. — Nature London 178, 978 (1956)

(4) ANCERL, P. u. VITEMBERGER, P. — C. R. Soc. Biol., Paris, 92, 517 (1925)

(5) ANDERSON, E. H. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 37, 340 (1951)

(6) ANDERSON, R. S. u. TURKOWITZ, H. — Am. J. Roentgenol. Radium Terapy Nuclear Med., 46, 537 (1941)

(7) BACK, A. u. BLOCK-FRANKENTHAL, L. — Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 66, 366 (1947)

(8) BACQ, Z. M. — Transvanse recents sur les toxiques dequerre, Actualites Biochemiques, Desoer, Lüttich u. Masson, Paris (1947)

(9) BACQ, Z. M. — Experientia, 7, 11 (1951)

(10) BACQ, Z. M. u. ALEXANDER, P. — Grundlagen der Strahlenbiologie, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1958)

(11) BACQ, Z. M. u. HERVE, A. — Bull. Acad. Med. Belg. 6th series, 18, 13 (1952)

(12) BERGONIE, I. u. TRIBOUDEAU, L. — C. R. Acad. Sci., Paris, 143, 983 (1906)

(13) BERRIE, A. M. M. — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 39, 1125 (1953)

(14) BEYERINCK, M. W. — Versl. Afd. Natuurkunde Kond. Akad. Wetensch. Amsterdam, 9, 310 (1901) Folia Microbiologica, 1, 4 (1912)

(15) BILLEN, D. u. WHITTLE, R. — Effects of postirradiation temperature treatment on induced mutations in E. coli (1953)

(16) BLINKS, L. R. — J. cell. comp. Physiol., 39, Suppl. 2, 11 (1952)

(17) BRACHET, J. u. CHANTRENNE, H. — Nature, London, 163, 950 (1945)

(18) BRAUN, W. — J. Bact., 51, 327 (1946)

(19) BRAUN, W. — Bact. Rev., 11, 75 (1947)

(20) BRAUN, W. — J. Bact., 53, 250 (1947)

(21) BRAUN, W. — Press of W. B. Saunders Company, Philadelphia (1957): Bacterial genetics

(22) BRYSON, V. — J. Bact., 56, 423 (1948)

(23) BRYSON, V. u. DAVIDSON, H. — Proc. Nat. Acad. Sci., 37, 784 (1951)

(24) CHINN, B. D. — J. Infections Diseases, 59, 137 (1936)

(25) CLOWES, R. C. u. ROWLEY, D. — J. gen. Microbiol., 13, 461 (1955)

(26) COLWELL, C. A. — J. Bact., 52, 417 (1946)

(27) CONGER, A. D. u. FAIRCHILD, L. M. — Proc. nat. Acad. Sci., 38, 289 (1952)

(28) COWIE, D. B. u. COHEN, G. N. — Biochem. et. Biophys. Acta, 26, 252 (1957)

(29) DALE, W. M., GRAY, L. H. u. MEREDITH, W. J. — Phil. Trans., 242 A, 33 (1949)

(30) D'AMATO, F. u. GUSTAFSON, A. — Hereditas, 34, 181 (1948)

(31) DAVIS, B. D. — Arch. Biochem., 20, 116 (1949)

(32) DEMEREC, M. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 32, 36 (1946)

(33) DEMEREC, M. u. CAHN, E. — J. Bacteriol., 65, 27 (1953)

(34) DESKOWITZ, M. W. — Bacterial variation as studied in certain unstable variants J. Bacteriol., 33, 349 (1937)

(35) DEVI, P., PONTOCORVO, G. u. HIGGINBOTTOM, P. — Nature, 160, 503 (1947)

(36) DICKINSON, L. — J. Bacteriol., 57, 235 (1945)

(37) DUFF, D. C. B. — J. Bacteriol., 34, 49 (1937)

(38) DURHAM, N. N. u. WYSS, O. — J. Bacteriol., 70, 95 (1956)

(39) DURYEE, W. R. — J. nat. Cancer Inst., 10, 735 (1949)

(40) ENDERLEIN, G. — Bakterien-Cyclogenie, W. de Gruyter u. Co., Berlin, 1 - 390 (1925)

(41) EPHRUSSI, G. — Oxford: Clarendon Press (1953)

(42) EPHRUSSI, B. u. HOTTINGUER, H. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16, 75 (1951)

(43) von EULER, H. u. HAHN, L. — Acta radiol. Stockh., 27, 268 (1946)

(44) EYRING, E., HIRSCHFELD u. TAYLOR — J. chem. Phys., 4, 479 (1936)

(45) FORSSBERG, A. — Acta Radiol., 22, 252 (1941)

(46) FROMME, B. — Centralbl. f. Bakt. I, Orig 58, 445 (1911)

(47) GETLOW, R. u. DOYLE, B. — Arch. Biochem. Biophys., 46, 46 (1953)

(48) GILLESPIE, W. A. — J. Path. Bact., 64, 55 (1952)

(49) GLOVER, S. W. — Carnegie Institution of Washington Publication, 612, 121 (1956)

(50) GRAY, L. H. — Brit. J. Radiol., 30, 403 (1957)

(51) GROWTHER, I. A. — Proc. rev. Soc., B 96, 207 (1924)

(52) HADDOW, A. — J. Inf. Dis., 63, 129 (1938)

(53) HADDOW, A., KOU, G. A. R. u. ROSS, W. C. — Nature, London, 162, 824 (1948)

(54) HADLEY, P. — J. Inf. Dis., 40, 1 (1927)

(55) HADLEY, P. — J. Inf. Dis., 60, 129 (1937)

(56) HADLEY, P. u. DELVES, E. u. KLIMEK, I. — J. Inf. Dis., 48, 1 (1931)

(57) HALE, I. H. — Brit. J. exp. Path., 32, 307 (1951)

(58) HENRY, B. S. — J. Inf. Dis., 52, 374 (1933)

(59) HINSHELWOOD, C.N. — Oxford University Press, London (1947): The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell

(60) HOHN, P. u. HERMANN — Zbl. Bakt. I. Orig., 148, 47 (1942)

(61) HOLLAENDER, A. u. STAPLETON, G. E. — Federation Proc., 12, 70 (1953)

(62) HOLLAENDER, A. u. STAPLETON, G. E. — Physiol. Reviews, 33, 77 (1953)

(63) HOLLAENDER, A. u. STAPLETON, G. E. — Ciba Foundation, London: Churchill Ltd., 216 (1956): Symp. in Radiation an Cell Metabolism

(64) HOLLAENDER, A., STAPLETON u. BILLEN — Trans. Faraday Soc., 49, 331 (1953)

(65) HOLLAENDER, A., STAPLETON, G. E. u. MARTIN, F. L. — Nature, 167, 103 (1951)

(66) JACOBSEN, K. A. — Centralbl. f. Bakt. I, 56, 208 (1910)

(67) JOLLOS, V. — Zentralbl. f. Bakt. Parasitenk. Infek. I, 93, 22 (1924)

(68) KAUFFMANN, F. — E. Munksgaard, Copenhagen: Enterobacteriaceae, 2. ed., pp 23 - 45

(69) KAUFFMANN, F. — E. Munksgaard, Kopenhagen, 1941: Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe

(70) KELNER, A. — J. Bacteriol., 58, 511 (1949)

(71) KELNER, A. — J. Bacteriol., 65, 252 (1953)

(72) KELNER, A., BELLAMY, W. D., STAPLETON, G. E. u. ZELLE, M. R. — Bacterial Rev., 19, 22 (1955)

(73) KIMBALL, R. F. — Annual Review of Microbiology, 11, 199 (1957)

(74) KONST, H. — The Genetics of Pathogenetic Organisms, AAAS Publ. 12, 34 (1940)

(75) KRISTENSEB, M. u. KAUFFMANN, F. — Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., 117, 426 (1935)

(76) de KRUIF, P. H. — J. Exp. Med., 33, 773 (1921)

(77) KUHN, P. u. STERNBERG, K. — Zentralbl. Bakt., 121, 113 (1931)

(78) LACASSAGNE, A. u. HOLWECK, F. — C. R. Acad. Sci. Paris, 188, 197 (1929 a)

(79) LATARJET, R. — Acta radiol., 41, 84 (1954)

(80) LEA, D. E. — Action of Radiol. on Living Cells, Cambridge Univ. Pr. (1946)

(81) LEA, D. E. — The Mac Millan Co., New York, N. Y. (1947)

(82) LEDERBERG, J., LEDERBERG, E.M., ZINDER, N. D. u. LIVELY, E. R. — Cold Spring Harbor Symposioa Quant. Biol., 16, 413 (1951)

(83) LEVIN, B. S. u. LOMINSKI, J. — C. R. Acad. Sci. Paris, 200, 873 (1935)

(84) LINCOLN, R. E. — J. Bacter., 54, 745 (1947)

(85) LINDEGREN, C. C. — Zbl. Bakt. II, 93, 113 (1935)

(86) LWOFF, A., SIMINOVITCH, L. u. KJEDGAARD, N. — Ann. inst. Pasteur, 79, 815 (1950)

(87) MALLMANN, W. L. — Mich. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull., 122 (1932)

(88) MANTEN, A. u. ROWLEY, D. — Brit. J. exp. Path., 34, 23 (1953)

(89) MANWARNING, W. H. — Science, 79, 466 (1934)

(90) MAYER, H. D. — Dissertation. Druk. Naamloze Vemotschap W. D., Meinema, Delft, Holland (1938)

(91) Mc. CONKEY — J. Hyg., 5, 333 (1908)

(92) Mc. KINNEY, R. A. u. MELLON, R. R. — J. Infections Diseases, 68, 233 (1941)

(93) Mc. LAREN, A. D. — Advances Enzymol., 9, 75 (1949)

(94) MELLON, R. R. — J. Bacter., 11, 203 (1926)
J. Bacter., 44, 1 (1942)

(95) MITCHELL, H. K. u. HONLAHAN, M. B. — Federation, Proc., 5, 370 (1946)

(96) MOHR, W. — Z. Hyg. Infektionskrankh., 116, 288 (1934)

(97) MORRIS, I. F., BARNES, C. G. u. SELLERS, T. F. — Am. J. Public. Health, 33, 246 (1943)

(98) MORRIS, I. F., SELLERS, T. F. u. BROWN, A. W. — J. Infections Diseases, 68, 117 (1941)

(99) MORTON, H. E. u. SOMMER, H. E. — J. Bacter., 47, 123 (1948)

(100) NEWCOMBE, H. B. — Genetics, 38, 134 (1953)

(101) NEWCOMBE, H. B. u. SCOTT, G. W. — Genetics, 34, 475 (1949)

(102) NEWCOMBE, H. B. u. WHITEHEAD, H. A. — J. Bacter., 61, 243 (1951)

(103) NORMANN, A. — Exptl. Cell Research, 2, 454 (1951)

(104) NORTH, W. R. u. BARTAM, M. T. — Appl. Microbiol., 1, 130 (1953)

(105) PAGE, L. A., GOODLOW, R. I. u. BRAUN, W. — J. Bacter., 62, 639 (1951)

(106) PAUL, I. R. — J. Exptl. Med., 36, 793 (1927)

(107) PELC, S. R. u. HOWARD, A. — Aarhus Symp., Heredelym, 6 Suppl., 261 (1953)

(108) PHILIPS, F. C. — J. Pharmacol., 99, 281 (1950)

(109) POLLARD, E. C. — Advance biol. med. Phys., 3, 153 (1954)

(110) RAHN, O. — J. Gen. Physiol., 14, 315 (1930)

(111) RUGH, R. — J. exp. Zool., 110, 357 (1949)

(112) RYAN, F. J. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 40, 178 (1954)

(113) RYAN, F. J. u. SCHNEIDER, L. K. — Genetics, 34, 72 (1949)

(114) SAX, K. — AAAS Symp. Radiobiol.: Nucleonics, 8, 28 (1952)

(115) SCHNEWEIS, K. E. — Zentralbl. Bakt., 176, I, 71 (1959)

(116) SCHNITZER, R. J., CAMAGNI, L. J. u. BUCK, M. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 53, 75 (1943)

(117) SCHÖNBERG, F. — Lebensmitteltierarzt, 4, 137 (1953)

(118) SEIFFERT, W. — Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Inf. I. Ref., 121, 143 (1936)

(119) SEPPILLI, A. — 3rd Intern. Congr. Microb., New York, Rept. Proc., 162 (1939)

(120) SEVAG, M. G. — Advances in Encymol., 6, 33 (1946)

(121) SHRIFT, A. — Am. J. Botanv, 41, 345 (1954 b)

(122) SONNEBORN, T. M. — Proc. Nat. Acad. Sci., 34, 413 (1948)

(123) SPEAR, F. F. — Chamman and Hall, London (1953): Radiation and Living Cells

(124) SPOERL, E., LOVELESS, L. E. u. a. — J. Bacter., 67, 394 (1954)

(125) STAPLETON, G.E., BILLEN, D. u. HOLLAENDER, A. — J. Bacter., 63, 805 (1952)

(126) STAPLETON, G.E., BILLEN, D. u. HOLLAENDER, A. — J. Cell. comp. Physiol., 41, 345 (1953)

(127) STOKES, G. L. u. BAYNE, H. T. — J. Bacter., 76, 136 (1958)

(128) STOKES, G. L. u. BAYNE, H. T. — J. Bacter., 74, 200 (1957)

(129) STUY, J. H. — J. Bacter., 79, 707 (1960)

(130) SULLIVAN, R. L. u. GROSCH, D. S. — Nucleonics, 11, 21 (1953)

(131) SWINGLE, E. L. — J. Bacter., 29, 467 (1935)

(132) THODAY, J. M. — J. Genetics, 43, 189 (1942)

(133) TIMAKOV, V. D. — Pergamon Press (1959): Microbial Variation

(134) ULBRICH, F. — Zbl. f. Bakt. I Orig., 169, 221 (1957)

(135) VOUREKA, A. — Lancet, i, 27 (1951)

(136) VOUREKA, A. — J. gen. Microbiol., 6, 352 (1952)

(137) WEED, L. L. u. LONGFELLOW, D. — J. Bacter., 67, 27 (1954)

(138) WEINBERG, E. D. — Department of Bacteriology and Parasitology, The University of Chicago, Chicago 37, Illinois (1950)

(139) WISE, R. J. u. SPINK, W. W. — J. clin. Invest., 33, 1611 (1954)

(140) WITKIN, E. M. — Genetics, 32, 221 (1947)

(141) WORSECK, M., SZABO de BUES, E. u. HEMLEP, I. — Zentralbl. f. Veterinärmed. V, 5, 391 (1958)

(142) WYCKOFF, R. G. W. — J. exper. Med., 52, 435 (1930)

(143) YOUMANS, G. P. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 36, 94 (1937)

(144) YOUMANS, G. P. u. DELVES, E. — J. Bacter., 44, 127 (1942)

(145) ZAMENHOF, S. — J. Bacter., 51, 351 (1946)

(146) ZELLE, M. — J. Inf. Dis., 71, 131 (1942)

(147) ZELLE, M. u. HOLLAENDER, A. — Radiolation biology, Vol. 2, Chapter 10 (1954)

(148) ZELLE, M., OGG, I. E. u. HOLLAENDER, A. — J. Bacter., 75, 190 (1958)

(149) ZLATA, D. u. HARTMAN — Carnegie Institution of Washington Publication, 612, 107 (1956)

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Meyn für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Gedek für seine Ratschläge bei der Anfertigung der Dissertation.

L E B E N S L A U F

Ich, Hans Weber, wurde am 14. Februar 1937 als Sohn des Direktors Hans Weber und seiner Gattin Elisabeth, geb. Birkhofer, in München geboren.

Am 23. 2. 1945 fiel mein Vater bei einem Bombenangriff in Treuchtlingen, nachdem meine Mutter, meine 3 Geschwister und ich schon im Sommer 1943 auf das großelterliche Gut Marienhof Kr. Kitzingen gezogen waren. Vom 1. 9. 1943 bis 1. 8. 1947 besuchte ich die Volksschule in Püssenheim. Am 1. 9. 1947 trat ich in die städtische Realschule in Marktbreit/Ufr. ein. Nach der 4. Klasse daselbst wechselte ich im Sommer 1951 zur Oberrealschule in Würzburg über, die ich von Püssenheim aus als Fahrschüler besuchte. Hier bestand ich am 26. Juli 1956 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1956/57 schrieb ich mich als Student der Tierheilkunde an der Universität München ein, an der ich alle 9 Studiensemester hindurch ununterbrochen immatrikuliert war. Nach dem 3. Semester im Februar 1958 bzw. nach dem 4. Semester im Juli 1958 legte ich die beiden Teile der Tierärztlichen Vorprüfung ab.

Am 27. 9. 1961 absolvierte ich, ebenfalls in München, die Tierärztliche Prüfung.

Seit dem 15. 10. 1961 bin ich als Veterinärpraktikant in der Praxisgemeinschaft Dr. Kaller/Vejoda in Bergtheim b. Würzburg tätig.